

PCT

 EP 18092 (1) 世界知的所有権機関
 国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

1/3



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO98/13524 (43) 国際公開日 1998年4月2日(02.04.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03438 (22) 国際出願日 1997年9月26日(26.09.97) (30) 優先権データ 特願平8/256833 1996年9月27日(27.09.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 佐藤至弘(SATO, Yoshihiro)[JP/JP] 〒471 愛知県豊田市大林町八丁目6-247 Aichi, (JP) 辻 明彦(TSUJI, Akihiko)[JP/JP] 菅 隆之(SUGA, Takayuki)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NO, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 <div data-bbox="1177 819 1453 1081" style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 10px; text-align: center;"> SEARCH REPORT 00.4.98 BBPA99-02 EPC </div>	

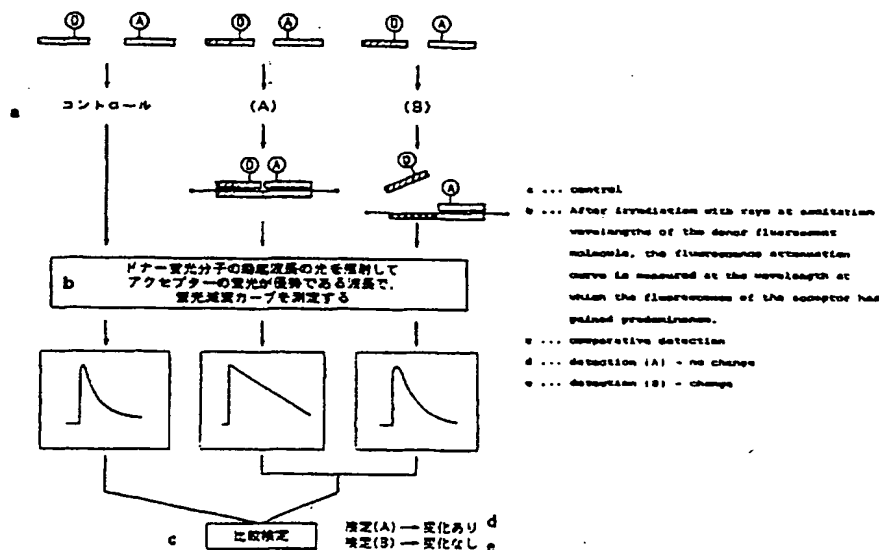
(54) Title: PROBES FOR DETECTING POLYNUCLEOTIDES AND DETECTION METHOD

(54) 発明の名称 ポリヌクレオチド検出用プローブ及び検出方法

(57) Abstract

Detection probes enabling very convenient and highly accurate and sensitive detection of DNAs or RNAs having specific base sequences in specimens in the presence of the probes in excess of the target nucleic acid; and a detection method. When mixed with a specimen containing the target substance (DNA, RNA, etc.) having a polynucleotide having a specific base sequence, two types of fluorescent label detection probes hybridize, while being adjacent to each other, with the target nucleic acid. As a result, there arises a shift of the resonance energy between the two types of fluorescent dye molecules. When the resonance energy shift occurs in the hybrid thus formed, the fluorescence attenuation of the acceptor fluorescent dye molecule can be sufficiently delayed compared with the fluorescence attenuation of the directly excited acceptor by appropriately regulating (1) the number of bases between the two nucleotides

to which the fluorescent dye molecules have bonded; (2) the structure (double- or single-stranded) of the hybrid between the two nucleotides to which the fluorescent dye molecules have bonded; and (3), on the detection probes, the sites of the nucleotides into which the fluorescent dye molecules are to be introduced; and by (4) using a pair of detection probes with the appropriate selection of the fluorescent dye molecules. The detection method comprises using the above-mentioned detection probes and detecting the target substance by measuring changes in the fluorescence attenuation curve of the acceptor after the irradiation with pulse excitation rays, thus enabling highly accurate and sensitive detection of the target nucleic acid in the presence of the detection probes in excess of the target nucleic acid.



(57) 要約

本発明は、検体試料中に含まれる特定の塩基配列をもつDNAやRNAを、検出用プローブが被検体核酸に対して過剰に存在する条件において、極めて簡便に、高精度・高感度に検出することを可能とする検出用プローブおよび検出方法に関する。

本発明に係る2種類の蛍光標識検出用プローブは、特定の塩基配列のポリヌクレオチドを有する被検体(DNAやRNAなど)を含む検体試料と混入した際、被検体核酸に互いに隣接してハイブリダイズし、その結果、2種類の蛍光色素分子間に共鳴エネルギー移動が生じるものである。また、この際形成されるハイブリッド体において、(1)蛍光色素分子が結合している2つのヌクレオチド間の塩基数、(2)蛍光色素分子が結合している2つのヌクレオチド間のハイブリッド体の構造(二本鎖又は一本鎖)、(3)蛍光色素分子が導入されるヌクレオチドの検出用プローブ上での位置を適切に設定し、かつ、(4)蛍光色素分子の種類を適切に選択した一組の検出用プローブを使用することにより、共鳴エネルギー移動がおきたときのアクセプター蛍光色素分子の蛍光減衰を、直接励起のアクセプターの蛍光減衰よりも十分に遅くさせることを可能とするものである。

本発明に係る検出方法は、係る検出用プローブを使用し、パルス励起光照射後のアクセプターの蛍光減衰カーブの変化を測定することにより被検体を検出する方法を用いることによって、検出用プローブが被検体核酸に対して過剰に存在する条件において、被検体核酸を高精度・高感度で検出することを可能とするものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	大韓民国	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア				
		LI	リヒテンシュタイン				

明細書

ポリヌクレオチド検出用プローブ及び検出方法

技術分野

本発明は、特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体（DNAやRNAなど）を含む検体試料に蛍光色素で標識された検出用プローブを混入して、その検体試料から発せられる蛍光を測定することにより、検体試料中の検出用プローブが結合した被検体を検出するための、検出用プローブおよび検出方法の技術に関するものである。

背景技術

試料中に存在する特定の塩基配列をもつDNAやRNAを検出・定量する方法として、検出対象となるDNAやRNAと特異的にハイブリダイズする「検出用プローブ」を利用する方法が広く使用されている。検出用プローブとしては、検出対象であるDNAやRNA（ターゲット核酸）の塩基配列の一部と相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチド核酸を用いることが多い。

これらの方法においては、検出用プローブとターゲット核酸とのハイブリッド体を形成させた後、ハイブリッド体形成にともなう変化を検出することにより、試料中に検出対象とするターゲット核酸が含まれていることを確認したり、その存在量を定量する。たとえば、検出用プローブを蛍光色素で標識しておく。この蛍光標識検出用プローブ（蛍光標識オリゴヌクレオチド核酸）を試料中に加える。試料中にターゲット核酸が存在すれば、蛍光標識検出用プローブはターゲット核酸に結合しハイブリッド体を形成する。その後、試料中のターゲット核酸とハイブリダイズした蛍光標識検出用プローブと、未結合の蛍光標識検出用プローブを分離する操作を行うことにより、未結合の蛍光標識検出用プローブを試料中より

除去する。ここで、試料の蛍光強度を測定すれば、試料中のターゲット核酸の量を定量することが可能である。

上で述べた方法では、検出用プローブを試料に添加した後に、未結合の検出用プローブを取り除く操作が必要であった。このような分離操作は実際上は繁雑であるため、プローブ添加後の、結合したプローブと未結合のプローブとの分離操作が不要であるアッセイ法（ホモジニアスアッセイ法）が、種々、試みられている。

ホモジニアスアッセイ法のひとつとして、2種類の蛍光分子間で生じる共鳴エネルギー移動を利用する方法がある。一般に、2種類の蛍光分子が約 70-80 オングストローム以内の距離にあると、蛍光分子間に相互作用が生じ（共鳴エネルギー移動）、蛍光スペクトルや蛍光減衰カーブが変化する。蛍光スペクトル上では、ドナー（一般に、2種類の蛍光分子のうち、吸収スペクトルが短波長側にあるもの）の蛍光強度が減少し、アクセプター（2種類の蛍光分子のうち、吸収スペクトルが長波長側にあるもの）の蛍光強度は増大する。また、パルス励起後の蛍光減衰カーブの変化としては、ドナーの減衰は速くなり、アクセプターの減衰は遅くなる。

この蛍光分子間の共鳴エネルギー移動を、核酸のホモジニアスアッセイに利用することが試みられている。すなわち、2種類の蛍光標識検出用プローブ（それぞれ異なる種類の蛍光色素分子で標識されている）を用意し、これらをターゲット核酸に互いに隣接してハイブリダイズさせる。ハイブリッド体においては、2種類の蛍光色素は近い距離にあるため、エネルギー移動がおこり蛍光スペクトルが変化する。すなわち、2種類の蛍光標識検出用プローブとターゲット核酸とからなるハイブリッド体形成にともない蛍光スペクトルが変化するため、蛍光スペクトル変化を測定することによって、ターゲット核酸の検出が可能となる（Cardullo, R.A., et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 8790-8794, EP0070685)。USP 4996143 には、蛍光スペクトル変化を測定することによってターゲット核

酸を検出する方法に適した蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブが示されている。

このように、エネルギー移動による蛍光スペクトル変化を測定する方法は、核酸のホモジニアスアッセイに有効である。しかしながら、試料中の検出用プローブの量（分子数）がターゲット核酸の量（分子数）よりも過剰になると、上述した蛍光スペクトル変化によりターゲット核酸を検出する方法を使用することは、實際上、非常に困難となる。すなわち、測定される蛍光スペクトルは、少数のエネルギー移動をおこしている蛍光色素分子からの蛍光スペクトルと多数のエネルギー移動をおこしていない蛍光色素分子（ターゲット核酸に未結合の蛍光標識検出用プローブ）からの蛍光スペクトルの和となるため、少数のエネルギー移動をおこしている蛍光色素分子からの蛍光スペクトルは多数のエネルギー移動をおこしていない蛍光色素分子からの蛍光スペクトルに埋没してしまい、エネルギー移動にともなう蛍光スペクトル変化を検出することは、實際上、不可能となる。

生物試料での実際の測定においては、「検出用プローブの量が検出対象の核酸（ターゲット核酸）の量に対して過剰になること」は頻繁に生じる。例えば、試料中のターゲット核酸の量が未知のときである。また、測定感度は試料の蛍光強度に依存するため、試料中の蛍光標識検出用プローブの濃度は一定濃度以下には下げられない。したがって、ターゲット核酸の量が微量であるとき（低濃度）は、検出用プローブの量がターゲット核酸に対して過剰になる。

したがって、検出用プローブが検出対象の核酸に対して過剰に存在する条件においても、検出対象核酸を精度よく検出することを可能とする方法が求められている。

一般に、蛍光分子間のエネルギー移動を検出・測定する方法としては、蛍光スペクトル変化を測定する方法とパルス励起後の蛍光強度の減衰カーブの変化を測定する方法（時間分解法）がある。エネルギー移動をおこしている蛍光分子とエネルギー移動をおこしていない同種の蛍光分子が共存しているときに、エネルギー移動を検出する方法としては、蛍光スペクトルの変化を測定するよりも、蛍光

減衰カーブを測定する（時間分解測定法）方法が有利となることがある（Morrison, L.E. (1980) *Analy.Chem.* 174 101-120、特開平 7-229835）。エネルギー移動によりアクセプターの蛍光減衰は遅くなるが、Morrison は、減衰の遅れが十分大きいときには、直接励起のアクセプターの蛍光減衰が実質的に終了した後の時間域において蛍光強度を測定することによって、エネルギー移動由来のアクセプターからの蛍光を選択的に測定することが可能であることを示した。特開平 7-229835 は、アクセプター蛍光波長域の蛍光減衰に加えてドナーの蛍光波長域における蛍光減衰も測定することにより、アクセプター蛍光波長域へのドナー由来の蛍光の混入により生じる検出のゆがみ（誤差）を補正する方法を提供している。

さらに、特開平 7-229835 には、特開平 7-229835 の方法（蛍光分子間のエネルギー移動を時間分解測定法により検出する一方法）を核酸のホモジニアスアッセイに適用すれば、検出用プローブがターゲット核酸に対して過剰に存在する条件においてもターゲット核酸が検出可能であることが述べられている。しかしながら、同方法に使用する検出用プローブが満たすべき必要条件是述べられていない。

発明の開示

本発明は、蛍光色素で標識された２種類の検出用プローブが同一の被検体（ターゲット核酸）に互いに隣接してハイブリダイズしてハイブリッド体を形成し、２種類の蛍光色素分子間にエネルギー移動が生じたときに、アクセプターとしての蛍光色素の蛍光減衰が十分に遅くなるような蛍光標識検出用プローブを見い出したものである。

また、当該プローブを用いて、ターゲット核酸を高感度に検出する方法を提供する。これにより、検出用プローブがターゲット核酸に対して過剰に存在する条件において、ターゲット核酸を高感度、高精度で検出することが可能となった。

エネルギー移動を利用して、検出用プローブがターゲット核酸に対して過剰に存在する条件において高感度でターゲット核酸を検出可能とするためには、2種類の蛍光標識検出用プローブとターゲット核酸とから形成されるハイブリッド体において、エネルギー移動励起のアクセプターの蛍光減衰が、直接励起のアクセプターの蛍光減衰よりも大きく遅れることが必要であると考えた。

2種類の蛍光標識検出用プローブとターゲット核酸とから形成されるハイブリッド体において、エネルギー移動励起のアクセプターの蛍光減衰カーブの遅れの大きさは、(1) 蛍光色素分子が結合している2つのヌクレオチド間の塩基数(2つの蛍光色素分子間の平均距離を規定する)、(2) 蛍光色素分子が結合している2つのヌクレオチド間のハイブリッド体の構造(二本鎖または一本鎖)、(3) 蛍光色素分子が導入されるヌクレオチドの検出用プローブ上での位置、および(4) 蛍光色素分子の種類、に大きく依存することを見出した。これらの知見にもとづいて、検出用プローブとして、適切な蛍光色素の組み合わせを選択し、かつ、ハイブリッド体形成時において2種類の蛍光色素分子間の距離が適切になるように塩基間数を選択し、かつ、ハイブリッド体の蛍光色素分子間の構造が適切な設定になるようにすることによって、検出用プローブがターゲット核酸に対して過剰に存在する試料において、高感度でターゲット核酸を検出可能とする方法および検出用プローブを見い出すことに成功した。

蛍光スペクトル変化を測定することによりエネルギー移動を検出するときに使用する検出用プローブの必要条件(USP 4996143で開示されている)と、蛍光減衰カーブの変化を測定することによりエネルギー移動を検出するときに使用する検出用プローブに求められる条件(本発明)は大きく異なる。

蛍光スペクトルの変化量(ドナーの蛍光強度の減少量およびアクセプター蛍光強度の増大量)はエネルギー移動効率が大きいほど大きくなる。エネルギー移動効率は、ドナーとアクセプター間の距離の6乗に反比例するため、蛍光スペクトル変化によりエネルギー移動を精度よく検出するためには、実試料において、ド

ナーアクセプター間の距離を可能なかぎり近づけることが望ましい。USP 4996 143 では、核酸のハイブリッド体において実質的にエネルギー移動の検出が可能となるドナー色素-アクセプター色素間の距離（塩基数）は「2-7塩基」であり、さらに塩基間数が少ないほどよいとしている。一方、アクセプターの蛍光減衰カーブの遅れを測定することによりエネルギー移動を検出するときには、エネルギー移動効率は中程度（50%程度）が最も望ましいことがわかった。エネルギー移動効率が高くなるほど、アクセプターの蛍光量はより増大するが、蛍光減衰の遅れはより小さくなる。蛍光量の増大は減衰カーブの変化の検出を容易にするが、一方、減衰の遅れが小さくなることは変化の検出を困難にする。この相反する2つの要素から、被検体の検出のためには、エネルギー移動効率が高すぎても低すぎても不適となる。すなわち、被検体の検出のためには、ハイブリッド体を形成したときのドナー色素とアクセプター色素間の距離は、エネルギー移動効率が中程度となる距離（塩基間数）が最も望ましいこととなる（後述、図2）。例えば、蛍光色素として Bodipy 493/503（ドナー）とCy5（アクセプター）の組み合わせを使用したときには、この距離は、ハイブリッド体における塩基間数として「10-12塩基」となる（ハイブリッド体において、色素が結合している2つのヌクレオチド間が2本鎖構造をとるとき。後述）。

また、実試料においては、ドナー色素とアクセプター色素間の距離が固定されていることは少なく、時間とともに揺らいでいることが多い。このようなドナー色素-アクセプター色素間の距離の揺らぎは、色素分子の運動などによりもたらされるものであり、その揺らぎの大きさや速さは、ハイブリッド体の構造により大きく異なる。蛍光スペクトルの変化量は、ドナーとアクセプター間の平均距離（平均エネルギー移動効率）により決定されるため、これまでに検出用プローブの性質が検討されたときには、形成されるハイブリッド体における色素間の距離の揺らぎの大きさを考慮に入れる必要性は低かった。一方、蛍光減衰カーブは、一般に、2つの色素間の距離の揺らぎや分布に依存する。実際、ハイブリッド

体を形成した検出用プローブの蛍光色素分子の蛍光減衰カーブは、ハイブリッド体の構造により規定される色素分子の運動の範囲に大きく依存することがわかった。その結果、ハイブリッド体において蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間がすべて2本鎖構造をとるように検出用プローブを設計すること、そのとき、一方の蛍光色素の標識位置はオリゴヌクレオチドの末端とすることが、被検体の検出のためには最も望ましいことが明らかとなった。

本発明は、検出用プローブが被検体において大過剰である条件において被検体を精度よく検出することを可能とするために、エネルギー移動の時間分解測定法（蛍光減衰カーブの変化を測定する方法）による被検体の検出に適した検出用プローブを見い出したものである。

すなわち、本発明は、特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出するための1組の検出用プローブであって、

第1の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するドナープローブと、

第2の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するアクセプタープローブとからなり、かつ、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブに基づく蛍光の減衰カーブが、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブと前記被検体とのハイブリッド体を形成する際に有意に変化する検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブの前記第1の蛍光分子が結合するヌクレオチドと、前記アクセプタープローブの前記第2の蛍光分子が結合するヌクレオチド間が2本鎖構造である、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブが被検体に隣り合って連続してハイブリダイズする、検出用プローブを提供する

ものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、
前記第 1 の蛍光色素分子または前記第 2 の蛍光色素分子のいずれかが、被検体上で連続してハイブリダイズする前記 1 組の検出用プローブの隣り合う側の末端部である、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、
前記 1 組の検出用プローブと被検体から形成されるハイブリッド体において、ドナープローブとアクセプタープローブが被検体にハイブリダイズして、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の一部が 2 本鎖構造をとる、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、
前記ハイブリッド体において、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が 4 ～ 20 である、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、
前記ハイブリッド体において、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が 8 ～ 16 である、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、
前記第 1 の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団またはフルオロセイン系蛍光団のいずれかを有し、かつ、前記第 2 の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団またはローダミン系蛍光団のいずれかを有する、検出用プローブを提供するものである。

又、本発明は、上記記載の検出用プローブであって、さらに、
前記第 1 の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団を有し、かつ前記第 2 の蛍光分子が、インドシアニ

ン系蛍光団を有する、検出用プローブを提供するものである。

さらには、本発明は、特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

- (1) 第1の蛍光色素分子が結合し、前記のポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するドナープローブと、第2の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するアクセプタープローブとからなる1組の検出用プローブと、前記被検体からハイブリッド体を形成する第1のステップと、
- (2) 前記ハイブリッド体の前記第2の蛍光色素に基づく蛍光波長域の蛍光強度の減衰カーブを測定する第2のステップと、
- (3) 前記1組の検出用プローブの前記第2の蛍光色素に基づく蛍光波長域の蛍光強度の減衰カーブを測定する第3のステップと、
- (4) 前記第2および第3のステップで得られる蛍光減衰カーブの比較により前記ポリヌクレオチド塩基配列の存在を検出する第4のステップとからなる方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブの前記第1の蛍光分子が結合するヌクレオチドと、前記アクセプタープローブの前記第2の蛍光分子が結合するヌクレオチド間が2本鎖構造である、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブが被検体に隣り合って連続してハイブリダイズする、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記第 1 の蛍光色素分子または前記第 2 の蛍光色素分子のいずれかが、被検体上で連続してハイブリダイズする前記 1 組の検出用プローブの隣り合う側の末端部である、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記 1 組の検出用プローブと被検体から形成されるハイブリッド体において、ドナープローブとアクセプタープローブが被検体にハイブリダイズして、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の一部が 2 本鎖構造をとる、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が 4 ～ 20 である、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記第 1 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第 2 の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が 8 ～ 16 である、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記第 1 の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団またはフルオロセイン系蛍光団のいずれかを有し、かつ、前記第 2 の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団またはローダミン系蛍光団のいずれかを有する、方法を提供するものである。

又、本発明は、上記記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を

検出する方法であって、

前記第 1 の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団を有し、かつ前記第 2 の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団を有する、方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 A は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が 2 本鎖構造をとり、また、蛍光色素分子の一方は他のプローブとの隣接部に面する末端部に標識（結合）されているものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の位置は相互に交換可能である。

図 1 B は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が 2 本鎖構造をとり、また、蛍光色素分子は両者ともに各プローブの中間部に標識（結合）されているものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の位置は相互に交換可能である。

図 1 C は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が部分的に 2 本鎖構造であり、また、蛍光色素分子の一方は他のプローブとの隣接部位に面する末端部に標識されており、他方の蛍光色素分子は当該プローブの中間部に標識されているものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の位置は相互に交換可能である。

図 1 D は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が部分的に 2 本鎖構造であり、また、蛍光色素分子は両者ともに各プローブの中間部に標識されているものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の

位置は相互に交換可能である。

図 1 E は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が 1 本鎖構造であり、また、蛍光色素分子は両者ともに他のプローブとの隣接部に面する末端部に標識されているものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の位置は相互に交換可能である。

図 1 F は、本発明に係わる検出用プローブのいくつかの形態の 1 例を示すものであり、ハイブリッド体において、蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間が二本鎖構造となるように、第 3 のプローブ（蛍光非標識）を導入するものを示す。図で、ドナー色素とアクセプター色素の位置は相互に交換可能である。

図 2 は、本発明に係わる種々の検出用プローブの、被検体（ターゲット DNA）の検出の精度の比較を示した図である。検出用プローブとして、（1）蛍光色素分子の組み合わせの種類、（2）ハイブリッド体における蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間を一本鎖にしたときおよび二本鎖にしたとき、

（3）ハイブリッド体における蛍光色素分子が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基数（図の横軸）、を変えた。これらの検出用プローブを使用して、被検体とのハイブリッド体形成によるアクセプター波長域の蛍光減衰カーブの変化を測定した。図の縦軸（ $\Delta \tau / \sigma_{\text{off}}$ ）は、被検体が存在しているときの蛍光減衰カーブと被検体が存在していないときの蛍光減衰カーブとの識別の S/N を相対的にあらわしたパラメータである。

図 3 は、本発明に係わる検出用プローブおよび検出方法を使用して、被検体の存在を検出する概念図である。

図 4 は、一組の検出用プローブ（蛍光色素分子で標識されたオリゴ DNA）と被検体であるターゲット DNA とを、プローブが過剰になるような種々の比率で混合したときのアクセプター波長域の蛍光減衰カーブをあらわしたものである。検出用プローブは、ドナー蛍光色素は Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素は C

y5、ハイブリッド体形成時におけるドナー蛍光色素が結合しているヌクレオチドとアクセプター蛍光色素が結合しているヌクレオチド間は12塩基離れ、その間は二本鎖になるものを使用している。ターゲットDNAとプローブの比率は、①0%、②1%、③3%、④5%、⑤20%（ターゲットDNA／プローブ、モル比）である。

図5は、図4に示された試料（一組の検出用プローブと被検体であるターゲットDNAとを、プローブが過剰になるような種々の比率で混合したもの）における蛍光スペクトルを示したものである。検出用プローブは、ドナー蛍光色素は Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素は Cy5、ハイブリッド体形成時におけるドナー蛍光色素が結合しているヌクレオチドとアクセプター蛍光色素が結合しているヌクレオチド間は12塩基離れ、その間は二本鎖になるものを使用している。ターゲットDNAとプローブの比率は、①0%、②1%、③3%、④5%、⑤20%（ターゲットDNA／プローブ、モル比）である。

図6Aは、本発明に係わる検出用プローブおよび同プローブを用いた検出方法の応用例の一例を示した概念図であり、核酸の一次構造の変化のなかで、DNAの特定部位に他のDNA断片が組み込まれる変化を検出することに使用可能であることを示すものである。

図6Bは、本発明に係わる検出用プローブおよび同プローブを用いた検出方法の応用例の一例を示した概念図であり、核酸の一次構造の変化のなかで、DNAの特定部位に他のDNA断片が組み込まれる変化を検出することに使用可能であることを示すものである。

図7は、本発明に係わる検出用プローブおよび同プローブを用いた検出方法の応用例の一例を示した概念図である。核酸の一次構造の変化のなかで、DNAの特定部位の方向が逆転する変化（逆位）を検出することに使用可能であることを示す。

図8は、本発明に係わる検出用プローブおよび同プローブを用いた検出方法の応

用例の一例を示した概念図である。核酸の一次構造の変化のなかで、DNAの特定部位が欠失する変化を検出することに使用可能であることを示す。

図9は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブを示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が4塩基 ($n=4$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図10は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブを示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が8塩基 ($n=8$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図11は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブを示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が10塩基 ($n=10$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 2 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブを示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基間数が 1 2 塩基 ($n = 1 2$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 3 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブを示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基間数が 1 4 塩基 ($n = 1 4$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 4 は、図 9 - 図 1 3 に対するコントロールの蛍光減衰カーブ (●) であり、検出用プローブの蛍光減衰カーブを示す (被検体たる DNA は含まれていない)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 5 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) を示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 1 0 塩基離れている ($n = 1 0$)。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間が、すべて二本鎖になる検出用プローブを使用したと

きの蛍光減衰カーブ (●) である。 ▲は励起光パルスをあらわす。

図 1 6 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) を示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 10 塩基離れている ($n=10$)。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間が、一本鎖となる部分が 2 塩基であり二本鎖となる部分が 8 塩基になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 7 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) を示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 10 塩基離れている ($n=10$)。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間が、一本鎖となる部分が 4 塩基であり二本鎖となる部分が 6 塩基になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 1 8 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) を示す。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 10 塩基離れている ($n=10$)。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間が、一本鎖となる部分が 6 塩基であり二本鎖となる部分

が4塩基になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ(●)である。

▲ は励起光パルスをあらわす。

図19は、図15-図18に対するコントロールの蛍光減衰カーブであり、検出用プローブの蛍光減衰カーブ(●)をあらわす(被検体たるDNAは含まれていない)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図20は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ(●)を示す。ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間は10塩基離れており($n=10$)、その間は二本鎖を形成している。ドナープローブにおける Bodipy493/503 の標識位置を5'末端とした検出用プローブ(ハイブリッド体において2つのプローブが隣接するヌクレオチドにBodipy493/503が結合している)を使用したときの、蛍光減衰カーブ(●)である。アクセプタープローブにおけるCy5の標識位置は $n=10$ となる位置である(中間標識)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図21は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ(●)を示す。ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間は10塩基離れており($n=10$)、その間は二本鎖を形成している。ドナープローブにおける Bodipy493/503 の標識位置を、ハイブリッド体における2つのプローブの切れ目の位置(アクセプタープローブと隣接する位置、ドナープローブの5'末端)から内側に1塩基ずれた位置とした検出用プローブを使用したときの、蛍光減衰カーブ(●)である。アクセプタープローブにおけるCy5の標識位置は $n=10$ となる位置である(中間標識)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図22は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ(●)を示す。ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素

として Cy5 を使用した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 10 塩基離れており ($n = 10$)、その間は二本鎖を形成している。ドナープローブにおける Bodipy493/503 の標識位置を、ハイブリッド体における 2 つのプローブの切れ目の位置 (アクセプタープローブと隣接する位置、ドナープローブの 5' 末端) から内側に 2 塩基ずれた位置とした検出用プローブを使用したときの、蛍光減衰カーブ (●) である。アクセプタープローブにおける Cy5 の標識位置は $n = 10$ となる位置である (中間標識)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 3 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) を示す。ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用した。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は 10 塩基離れており ($n = 10$)、その間は二本鎖を形成している。ドナープローブにおける Bodipy493/503 の標識位置を、ハイブリッド体における 2 つのプローブの切れ目の位置 (アクセプタープローブと隣接する位置、ドナープローブの 5' 末端) から内側に 4 塩基ずれた位置とした検出用プローブを使用したときの、蛍光減衰カーブ (●) である。アクセプタープローブにおける Cy5 の標識位置は $n = 10$ となる位置である (中間標識)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 4 は、図 2 0 - 図 2 3 に対するコントロールの蛍光減衰カーブであり、検出用プローブの蛍光減衰カーブ (●) をあらわす (被検体たる DNA は含まれていない)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 5 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy3.5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy3.5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチ

ド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基間数が 8 塩基 ($n = 8$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 6 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy3.5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy3.5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基間数が 12 塩基 ($n = 12$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 7 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy3.5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy3.5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間は二本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基間数が 16 塩基 ($n = 16$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 8 は、図 2 5 - 図 2 7 に対するコントロールの蛍光減衰カーブであり、検出用プローブの蛍光減衰カーブ (●) をあらわす (被検体たる DNA は含まれていない)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図 2 9 は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。

また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が4塩基 ($n = 4$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図30は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が8塩基 ($n = 8$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図31は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が10塩基 ($n = 10$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図32は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌ

クレオチド間の塩基間数が12塩基 ($n = 12$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図33は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が15塩基 ($n = 15$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図34は、検出用プローブとして以下の一組を使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。すなわち、ドナー蛍光色素として Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素として Cy5 を使用し、かつ Bodipy493/503 はドナープローブの 5' 末端に標識し、Cy5 はアクセプタープローブの中間部のヌクレオチドに標識した。また、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間是一本鎖を形成する。ハイブリッド体において、蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の塩基間数が20塩基 ($n = 20$) になる検出用プローブを使用したときの蛍光減衰カーブ (●) である。▲ は励起光パルスをあらわす。

図35は、図29-図34に対するコントロールの蛍光減衰カーブであり、検出用プローブの蛍光減衰カーブ (●) をあらわす (被検体たるDNAは含まれていない)。▲ は励起光パルスをあらわす。

図36は、一組の検出用プローブ (蛍光色素分子で標識されたオリゴDNA) と被検体であるターゲットRNAとを、プローブが過剰になるような種々の比率で混合したときのアクセプター波長域の蛍光減衰カーブをあらわしたものである。検出用プローブは、ドナー蛍光色素は Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素は Cy5、ハイブリッド体形成時におけるドナー蛍光色素が結合しているヌクレオチ

ドとアクセプター蛍光色素が結合しているヌクレオチド間は二本鎖、塩基間数は12 ($n=12$) になるものを使用している。ターゲットRNAとプローブの比率は、①0%、②2.5%、③5%、④20% (ターゲットRNA/プローブ、モル比) である。

図37は、図36に示された試料 (一組の検出用プローブと被検体であるターゲットRNAとを、プローブが過剰になるような種々の比率で混合したもの) における蛍光スペクトルを示したものである。検出用プローブは、ドナー蛍光色素は Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素は Cy5、ハイブリッド体形成時におけるドナー蛍光色素が結合しているヌクレオチドとアクセプター蛍光色素が結合しているヌクレオチド間は二本鎖、塩基間数は12 ($n=12$) になるものを使用している。ターゲットRNAとプローブの比率は、①0%、②2.5%、③5%、④20% (ターゲットRNA/プローブ、モル比) である。

図38は、一組の検出用プローブ (蛍光色素分子で標識されたS-オリゴ) と被検体であるターゲットRNAとを、プローブが過剰になるような種々の比率で混合したときのアクセプター波長域の蛍光減衰カーブをあらわしたものである。検出用プローブは、ドナー蛍光色素は Bodipy493/503、アクセプター蛍光色素は Cy5、ハイブリッド体形成時におけるドナー蛍光色素が結合しているヌクレオチドとアクセプター蛍光色素が結合しているヌクレオチド間は二本鎖、塩基間数は10 ($n=10$) になるものを使用している。ターゲットRNAとプローブの比率は、①0%、②2.5%、③5%、④20% (ターゲットRNA/プローブ、モル比) である。

発明を実施するための最良の形態

被検体

本発明に係わる検出用プローブおよび検出方法を用いて検出する被検体は、その種類、構造、長さ等において特に制限はなく、通常の核酸および核酸類似体を

含む。例えば、DNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド等があげられる。また、被検体は、本発明に係わる検出用プローブが実質的に特異的に結合する特定の塩基配列をもつ構造を被検体の一部として有するものを含む。このとき、被検体は、そのすべてが核酸構造を有する必要はない。したがって、本発明に係わる検出方法の使用においては、被検体の核酸および核酸類似体のすべての塩基配列が知られている必要はなく、本発明に係わる検出用プローブを特異的に結合させる特定の部分の塩基配列が知られていればよい。

被検体における上記特定部分の塩基配列を知るためには、公知の塩基配列決定方法を使用すればよい。

検出用プローブ

本発明に係わる検出用プローブは、異なる種類の蛍光色素分子で標識された2つの蛍光標識オリゴヌクレオチドを一組として使用するものである。

検出用プローブの骨格をなす核酸の部分については、DNAやRNAに制限されるものではなく、一般に使用されている種々の核酸類似体でもよい。たとえば、りん酸エステル部をホスホロチオエートにしたもの（S-オリゴ）やメチルホスホネートにしたもの（M-オリゴ）、メチルホスホロチオエートにしたものなどがある。また、ホスホジエステル結合をアミド、スルホアミド、エチレングリコール、チオフォーマルに置き換えたものなどがある。また、糖への修飾をしたものでもよい。たとえば、リボースの2'位を、2'-O-アルキル、2'-O-アシル、2'-ハロゲン、2'-アミノ体に修飾したものなどである。また、ポリアミド核酸（PNA）でもよい。

各プローブの塩基数には特に制限はない。被検体であるターゲット核酸と安定したハイブリッド体を形成すること、被検体以外の核酸との誤認識によるハイブリッド体形成の確率が低いこと、の条件を満足すればよい。この目的のためには、通常は10塩基以上あればよく、好ましくは15塩基以上である。また、2つの

プローブの合計塩基数も特に制限はない。被検体のターゲット核酸の特定の塩基配列部位に2つのプローブがともにハイブリダイズすることが可能であればよい。通常、20塩基以上、好ましくは30塩基以上である。

本発明に係わるプローブの塩基配列は、被検体に検出用プローブが結合（ハイブリダイズ）する被検体中の特定部位の塩基配列と相補的なものとすればよい。このとき、検出用プローブが被検体中の上記特定部位に実質的にハイブリダイズするのであれば、検出用プローブの塩基配列の一部は被検体中の上記特定部位の塩基配列と相補性をもたなくともよい。

本発明に係わるプローブは、被検体であるターゲット核酸とハイブリッド体を形成したときに、アクセプター蛍光色素の蛍光減衰が大きく遅れるものである。本発明に係わるプローブは、そのために、蛍光色素の組み合わせ、ハイブリッド体における蛍光色素分子が結合しているヌクレオチド間の塩基数、ハイブリッド体における蛍光色素分子が結合しているヌクレオチド間を一本鎖とするか二本鎖とするか、ハイブリッド体における蛍光色素分子の位置、を適切に設定したものである。

一般に、ドナー色素、アクセプター色素がそれぞれ単独で存在しているとき、パルス励起したときのそれぞれの蛍光強度の減衰は、それぞれの分子に固有の時間定数（蛍光寿命）で減衰する単一指数関数であらわされる（式（1）および（2））。

ドナーが単独で存在しているとき（ドナー—アクセプター間にエネルギー移動がおきていないとき）のドナーの蛍光減衰カーブ

$$I_d(t) = \exp(-t/\tau_d) \quad \tau_d: \text{ドナーの蛍光寿命} \quad (\text{式1})$$

アクセプター単独で存在しているとき（ドナー—アクセプター間にエネルギー移動がおきていないとき）のアクセプターの蛍光減衰カーブ

$$I_a(t) = \exp(-t/\tau_a) \quad \tau_a: \text{アクセプターの蛍光寿命} \quad (\text{式 } 2)$$

ドナーとアクセプターとの間で共鳴エネルギー移動がおこると、ドナーの蛍光減衰は速くなり、アクセプターの蛍光減衰は遅くなる。ドナー分子とアクセプター分子の間の距離が固定されているとしたときのドナーの蛍光減衰カーブは式(3)であらわされる。ここで、蛍光寿命 τ_{da} はエネルギー移動の効率 E により規定される。すなわち、エネルギー移動の効率が高くなるほど、ドナーの蛍光減衰は速くなる。

エネルギー移動をおこしているドナーの蛍光減衰カーブ

$$I'_d(t) = \exp(-t/\tau_{da}) \quad (\text{式 } 3)$$

$$\tau_{da} = \tau_d(1-E)$$

一方、アクセプターの蛍光減衰カーブは式(4)であらわされる。この減衰カーブは単一指数関数ではない。

エネルギー移動励起のアクセプターの蛍光減衰カーブ

$$I'_a(t) = \int_0^t \exp\left(-\frac{(t-\tau)}{\tau_{da}}\right) \cdot \exp(-\tau/\tau_a) d\tau \quad (\text{式 } 4)$$

上述したように、式(3)および式(4)は、ドナー分子とアクセプター分子の間の距離が固定されているとしたときの減衰カーブである。ドナー-アクセプター間の距離が固定されておらず揺らいでいるときには、式(3)(4)の(エネルギー移動時のドナーの蛍光寿命)は定数ではなく、揺らぎにともなうドナー-アクセプター間の距離の分布をあらわす関数が組み込まれる。

2つの蛍光色素分子間のエネルギー移動を時間分解法で測定することにより検出用プローブがターゲット核酸に対して過剰に存在する条件においてターゲット核

酸を高感度で検出するためには、式（４）であらわされる蛍光減衰カーブと式（２）であらわされる蛍光減衰カーブの差を大きくすることが必要である。式（４）の蛍光減衰カーブは、ドナーの蛍光寿命、アクセプターの蛍光寿命、エネルギー移動効率、ドナー－アクセプター間の距離の揺らぎの大きさ、により、式（２）はアクセプターの蛍光寿命により規定されている。

したがって、蛍光色素の組み合わせ、ハイブリッド体における２つの蛍光色素分子間の平均距離（エネルギー移動効率を主に規定する）、およびその揺らぎの大きさを相互に適切に設定すればよい。

なお、蛍光色素の組み合わせは、次の条件を満たすものが好ましい。

- １．ドナーの蛍光寿命がアクセプターの蛍光寿命よりも長く、その差が大きい。
- ２．ドナーの励起波長において、アクセプターが励起される確率が低い。

（ドナーの吸収極大での分子吸光係数 \gg ドナーの吸収極大でのアクセプターの分子吸光係数）

- ３．ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの蛍光スペクトルの重なりが小さい。（アクセプターの蛍光波長域へのドナーの蛍光の混入が少ない）

上記の条件を満たす蛍光色素の組み合わせとしては、例えば、ドナー色素として Bodipy (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indance) 系色素またはフルオレッセン系色素を使用し、これらにアクセプター色素としてインドシアニン系色素またはローダミン系色素を組み合わせたものがある。

ハイブリッド体における２つの蛍光色素分子間の平均距離は、ハイブリッド体における２つの蛍光色素分子間が結合しているヌクレオチド間の塩基数により決まる。また、蛍光色素分子間の距離の揺らぎの大きさは、ハイブリッド体において２つの蛍光色素分子が結合しているヌクレオチド間が一本鎖構造であるか二本鎖構造（図１を参照）であるか、ハイブリッド体における蛍光色素分子の位置、および蛍光色素分子とオリゴヌクレオチドとのリンカーの構造と長さなどにより決定されると予想される。

表 1 は、実施例に基づき、種々の蛍光標識プローブとターゲット DNA とのハイブリッド体において、アクセプター波長域の蛍光減衰カーブの遅れが観測された例をまとめたものである。種々の蛍光標識プローブを作製し、各一組のプローブとターゲット DNA を混合してハイブリッド体を形成させた。ハイブリッド体を高速液体クロマトグラフィーを用いて分離し、蛍光スペクトルおよび蛍光減衰カーブを測定した。また、各一組のプローブについて、ターゲット DNA を含まない試料において蛍光スペクトルおよび蛍光減衰カーブを測定し、ハイブリッド体形成にともなう蛍光スペクトルの変化および蛍光減衰カーブの変化（遅れ）を観察した（詳細は実施例の項参照）。

表 1

蛍光分子 ドナー／ アクセプター	蛍光分子 間構造	蛍光分子間 の塩基数 (n)	蛍光スペク トル変化	アクセプター 波長域の蛍光 減衰の遅れ
BODIPY/Cy5	1 本鎖	4,8,10,12,15,20	+	+++
	2 本鎖	4,8,10,12,14	+	++++
BODIPY/Cy3.5	2 本鎖	8,12,16	+	++
FITC/Cy5	1 本鎖	12,15,20	+	+
	2 本鎖	10,12	+	++
FITC/Cy3	1 本鎖	12,15,20	+	-
	2 本鎖	10,13,15	+	+
FITC/ロ-タミソ	1 本鎖	4,8,12,15,20	+	-
	2 本鎖	15	+	+

「Bodipy」はモレキュラープローブス社 (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) の商標である。また、特にことわりのない限り、実施例の「Bodipy」は「Bodipy 493/503」である。また、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5はアマーシャム社 (Amersham)の商標である。

使用したすべての種類の検出用プローブにおいて、ハイブリッド体形成による蛍光スペクトル変化が観測された。これは、ハイブリッド体形成により、エネルギー移動がおきることを示している。アクセプター波長域の蛍光減衰カーブの遅れの大きさは、検出用プローブの種類により大きな差が認められた。表1の「アクセプター波長域の蛍光減衰の遅れ」の項で、++++は蛍光減衰に極めて大きな遅れが生じることをあらわし、+++は蛍光減衰に大きな遅れが生じることを、++は蛍光減衰に遅れが生じることを、+は蛍光減衰に遅れが認められることをあらわす。－は蛍光減衰に遅れが認められないことをあらわす。

蛍光色素の組み合わせとしては、Bodipy/Cy5 が最も好ましく、次いで、Bodipy/Cy3.5、FITC/Cy5 の順となる。FITC/Cy3、FITC/ローダミンの組み合わせは、ハイブリッド体において蛍光色素間を二本鎖構造とするときには使用可能である。ドナー色素として、Bodipy が FITC よりも優れているのは、主に、Bodipy の蛍光寿命 (約7ナノ秒) が FITC の蛍光寿命 (約4ナノ秒) よりも長いため、アクセプター色素の蛍光寿命 (Cy5 は約1ナノ秒、ローダミンは約3ナノ秒) との差が大きくなることに起因すると考えられる。また、FITC/Cy3、FITC/ローダミンのように、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの蛍光スペクトルの分離がよくない組み合わせを用いたときには、ハイブリッド体における蛍光色素間を二本鎖構造としたときには蛍光減衰の遅れが生じたが、一本鎖構造としたときには蛍光減衰の遅れは認められなかった。

表1から明らかなように、ハイブリッド体における蛍光色素間の構造を二本鎖とする方が一本鎖とするよりも、蛍光減衰に大きな遅れが生じることがわかる。ハイブリッド体において、2つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間が一本

鎖構造のときには、一本鎖となっている部分の分子運動の自由度は大きいため、ドナー色素とアクセプター色素の相対的な空間位置は大きく揺らぐと考えられる。すなわち、2つの色素間の距離は、時間により大きく揺らいでいる。一方、二本鎖構造の場合は、その部分の分子運動の自由度は一本鎖のときよりもはるかに制限されるため、ドナー色素とアクセプター色素間の距離の揺らぎや分布は小さくなる。実施例の結果は、ドナー色素とアクセプター色素間の距離の揺らぎが小さい方が、すなわち、ハイブリッド体における2つの蛍光色素間の構造を二本鎖とする方が、蛍光減衰に大きな遅れが生じることを示している。

上記および実施例に示したように、ターゲット核酸とのハイブリッド体形成にともない大きな蛍光減衰の遅れを生ずる種々の一組の蛍光標識プローブが存在する。これらのプローブを用いたときの、ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの変化の検出の精度を定量的に比較するために以下の解析をおこなった。

ハイブリッド体形成にともない（エネルギー移動により）、アクセプターの蛍光は増加するが、その増加量は各プローブごとに異なる（エネルギー移動効率に依存するため）。したがって、ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの変化を識別する精度は、減衰カーブの変化の大きさと蛍光の光量の変化量により決まる。

各一組のプローブの評価は、ハイブリッド体を形成したプローブの蛍光減衰カーブとハイブリッド体を形成していないときのプローブの蛍光減衰カーブの識別のS/N（シグナル／ノイズ比）を指標として行った。

2つの蛍光減衰カーブの識別のS/Nは、以下の手順で求めた（S.A.Soper, B.L.Legender, & D.C.Williams. (1995) *Analy.Chem.* 67 4358-4365 を参考にした）。

まず、ハイブリッド体を形成しているプローブの蛍光減衰カーブ、およびハイブリッド体を形成していないときのプローブ（ターゲット核酸が含まれていない試料）の蛍光減衰カーブそれぞれについて、パルス励起光照射後3ナノ秒から7

ナノ秒の時間域を用いて、減衰の速さ（蛍光寿命 τ ）を

$$\tau = -\Delta t / (\ln(D_1/D_0))$$

D_0 : 3 – 5 ナノ秒の時間域における蛍光量

D_1 : 5 – 7 ナノ秒の時間域における蛍光量

$$\Delta t = 2 \text{ ns}$$

の式により求めた。また、このときの測定値のバラツキの大きさ σ を

$$\sigma = \tau \times (-\ln(D_1/D_0)) / (1/D_0 + 1/D_1)^{1/2}$$

により求めた。 σ は測定を同一条件で多数回行ったときの測定値の分布の標準偏差であり、蛍光量が増えるほど小さな値をとる（蛍光量が増えると、測定値のバラツキは小さくなる）。

ハイブリッド体を形成しているプローブの蛍光減衰カーブとハイブリッド体を形成していないときのプローブの蛍光減衰カーブの識別のS/N（シグナル／ノイズ比）は、蛍光寿命の差（ $\Delta\tau$ ）を測定値のバラツキの和（ $\sigma_{\Delta\tau}$ ）で減じた $\Delta\tau/\sigma_{\Delta\tau}$ であらわされる。

ここで、 $\Delta\tau = \tau$ （ハイブリッド体） $-\tau$ （プローブ）

$$\sigma_{\Delta\tau} = (\sigma^2(\text{ハイブリッド体}) + \sigma^2(\text{プローブ}))^{1/2}$$

表2 および図3は結果を示したものである（表2 および図3の $\Delta\tau/\sigma_{\Delta\tau}$ の値は相対値である）。

表 2

=====

BODIPY/CY5 (2本鎖)

	n=4	n=8	n=10	n=12	n=14
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.292	0.657	1.081	1.051	1.026

BODIPY/CY3.5 (2本鎖)

	n=8	n=12	n=16
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.449	0.733	0.760

FITC/CY5 (2本鎖)

	n=10	n=16
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.372	0.629

BODIPY/CY5 (1本鎖)

	n=4	n=8	n=10	n=12	n=15	n=20
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.066	0.052	0.221	0.382	0.638	0.832

BODIPY/CY5 (n=10, 1本鎖/2本鎖)

	6/4	4/6	2/8	0/10
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.333	0.463	0.837	0.933

BODIPY/CY5 (2本鎖, n=10) BODIPY色素の標識位置(ハイフリット体の切れ目の位置からの塩基数)

	0	1	2	4
$\Delta\tau / \sigma_{\Delta\tau}$	0.932	0.698	0.589	0.377

表 2 および図 3 は、Bodipy/Cy5、Bodipy/Cy3.5、FITC/CY5 の蛍光色素の組み合わせに対して、ハイブリッド体において色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の塩基数を変えたときの、蛍光減衰カーブの変化の識別の S/N を示している。また、表には、蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の構造の違い（一本鎖または二本鎖）による識別の S/N への影響をみるために、Bodipy/Cy5 の色素の組み合わせにおいて塩基間数を 10 に固定し、その間を一本鎖と二本鎖の混合構造として、一本鎖と二本鎖の比率を変えたときの S/N の変化を示した。また、ハイブリッド体における蛍光色素の標識位置の影響をみるために、Bodipy/Cy5 の色素の組み合わせにおいて塩基間数を 10 に固定し、Bodipy 標識プローブ（ドナープローブ）の Bodipy の標識位置を 5' 末端（切れ目の位置 = 0）から中間部へずらしたときの S/N の変化を示した。

以上の結果から、以下のことが明らかである。

(1) Bodipy/Cy5 の蛍光色素の組み合わせにおいて、2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間がハイブリッド体において二本鎖構造をとる場合は、2 つの蛍光色素の間の塩基数は 10 - 12 が最もよい。

(2) Bodipy/Cy5 の蛍光色素の組み合わせにおいて、2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間がハイブリッド体において一本鎖構造をとる場合は、識別の S/N は 2 つの蛍光色素の間の塩基数が増大するほどよくなる（ $4 < n < 20$ において）。 $n = 20$ における識別の S/N は、二本鎖構造のときと比較すると低い。

(3) Bodipy/Cy3.5 の蛍光色素の組み合わせにおいて、2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間がハイブリッド体において二本鎖構造をとる場合は、2 つの蛍光色素の間の塩基数に対する S/N の依存性は、Bodipy/Cy5 の組み合わせのときと同様の傾向を示す。しかしながら、 S/N の値は Bodipy/Cy5 よりも低い。

(4) FITC/Cy5 の蛍光色素の組み合わせにおいて、2 つの蛍光色素が結合して

いるヌクレオチド間がハイブリッド体において二本鎖構造をとる場合は、 S/N は Bodipy/Cy5 よりも低い値をとる。

(5) Bodipy/Cy5 の蛍光色素の組み合わせ (ハイブリッド体における 2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間の塩基数、 $n = 10$) において、2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間の構造を一本鎖と二本鎖の混合構造としたときには、すべて二本鎖の場合が、最もよい識別の S/N を与える。

(6) Bodipy/Cy5 の蛍光色素の組み合わせ (ハイブリッド体における 2 つの蛍光色素が結合しているヌクレオチド間の塩基数、 $n = 10$) において、Bodipy 標識プローブ (ドナープローブ) の Bodipy の標識位置は 5' 末端が最もよい。標識位置がプローブの中央部へと移行するにつれて、 S/N は低下する。

ここで (6) の結果は以下のように解釈される。2 つのプローブとターゲット核酸とからなるハイブリッド体において、2 つのプローブが隣り合っているヌクレオチドのところでは、プローブ側の鎖に切れ目が生じている。そのため、ターゲット核酸側の対応するホスホジエステル結合は運動の自由度が大きくなる。したがって、ハイブリッド体の水溶液中での運動にともなう 2 つの蛍光色素間の距離の揺らぎの大きさは、蛍光色素がハイブリッド体の切れ目の位置に近いほど小さいと予想される。(6) の結果は、ドナープローブまたはアクセプタープローブのどちらか一方を、ハイブリッド体において他のプローブと向き合う側の末端に標識することが、識別の S/N を最も増大させることを示している。

これらの結果から、本発明の実施例で使用する検出用プローブのなかで最適のものは、Bodipy/Cy5 を蛍光色素の組み合わせとして用いたもので、被検体とのハイブリッド体において Bodipy と Cy5 が結合しているヌクレオチド間が二本鎖構造を形成し、塩基間数が 10 - 12 となる一組のものであることがわかる。このとき、Bodipy、Cy5 のいずれかの色素はそれぞれの検出用プローブの末端に標識されている。

本発明に係わる検出用プローブにおいては、蛍光色素分子のオリゴヌクレオ

チドへの結合基については特に限定されないが、適当なリンカーを介して結合することが望ましい。このとき、リンカーがあまりに短い場合は、蛍光色素分子と核酸の骨格部や塩基部との相互作用が強くなり、その結果として、望まれる2つの蛍光色素分子間での共鳴エネルギー移動が十分におこななくなる可能性がある。また、リンカーがあまりに長い場合には、2つの蛍光色素分子が自由に運動して、2つの蛍光色素分子間の距離の揺らぎが大きくなりすぎる可能性が強いため好ましくない。本発明に係わる検出用プローブの好ましいリンカーの長さとしては、テトラメチレン鎖-デカメチレン鎖である。蛍光色素分子との結合は、公知の共有結合生成反応を用いることができる。例えば、アミド、エステル、エーテル結合等であるが、特にアミド結合が好ましい。本実施例で使用した検出用プローブは、リンカーとしてテトラメチレン鎖を使用したものである。

本発明に係わる検出用プローブに用いる蛍光色素の組み合わせのなかで、ドナー色素として「4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団 (Bodipy)」を有するものを使用し、これにアクセプター色素としてインドシアニン系蛍光団を有するものを組み合わせる例として、Bodipy 493/503 と Cy3、Cy3.5、Cy5 を組み合わせた例を示した。波長特性の異なる他の種類の Bodipy (Molecular Probes Inc.) および Cy5.5、Cy7 (Amersham) も使用可能である。例えば、「Bodipy-TMR, Cy5.5」や「Bodipy-TR, Cy7」の組み合わせがある。これらの組み合わせは、「Bodipy 493/503, Cy5」の組み合わせと同じく、ドナーとアクセプターとの蛍光寿命の差が約7倍であり、ドナーの蛍光スペクトルの極大波長とアクセプターの蛍光スペクトルの極大波長が約150 nm 離れている、という特徴を有している。「Bodipy-TMR, Cy5.5」「Bodipy-TR, Cy7」の組み合わせは、「Bodipy 493/503, Cy5」よりも波長が全体として、それぞれ、約50 nm、約100 nm 長波長側にシフトしたものである。一般に、生体試料は、発光する物質を含有していることが多いが、これらの発光は測定に対してバックグラウンド光となり、測定のS/Nを低下させる。これらのバックグラウンド光は、

一般に、長波長域になるほど発光量が減少するため、生体試料の高感度測定を行うときには、長波長域を使用する方が有利である。

被検体の検出方法

本発明に係わる検出用プローブを用いた被検体の検出は、例えば次のように行うことが可能である（図3参照）。

- (1) 検出用プローブを作製する。
- (2) 試料に検出用プローブを適当量加える。試料中に被検体が含まれていれば、検出用プローブの一部は被検体とハイブリッド体を形成する。
- (3) 蛍光時間分解測定が可能な測定装置を用いて、アクセプター波長域の蛍光減衰カーブを測定する。アクセプター波長域の蛍光には、ハイブリッド体形成にもとづくエネルギー移動励起の蛍光が含まれている。
- (4) 検出用プローブのアクセプター波長域の蛍光減衰カーブを測定する。
- (5) (3) で測定した蛍光減衰カーブと(4)で測定した蛍光減衰カーブを比較検定する。試料中に被検体が存在していれば蛍光減衰カーブは変化する。試料中に被検体が存在しない場合においては、2つの蛍光減衰カーブに有意の差はみられない。

プローブ過剰条件における被検体の検出の検定

本発明に係わる検出用プローブおよび検出方法は、プローブが被検体に対して大過剰である条件においても、被検体の存在を高精度で検出可能とするものである。図4に、検出用プローブとして、Bodipy/Cy5の蛍光色素の組み合わせを用い、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間が二本鎖構造をとり、その間の塩基数が12であるものを使用したときの結果を示す。これは、検出用プローブとターゲットDNAとの濃度比を変化させたときの蛍光減衰カーブの変化を示したものである。検出用プローブの濃度を一定にし、ター

ゲットDNAをモル比で0%（ターゲットDNAを加えないもの）、1%、3%、5%、20%となるように加えた。図4から明らかなように、検出用プローブがターゲット核酸に対し100倍量過剰であっても、十分に有意の差を示す蛍光減衰カーブが得られる。

図4であらわされた蛍光減衰カーブの変化の検定を定量的に行う方法の一例を以下に示す（表3）。蛍光減衰カーブにおいて、パルス励起光照射後1-9ナノ秒の時間域の蛍光強度の値を用いて、蛍光寿命 τ を求める。また、そのときの測定バラツキの大きさ（測定を同一条件で多数回行ったときの測定値の分布の標準偏差）を求める。

$$\tau = -\Delta t / (\ln(D_1/D_0))$$

D_0 : 1-5ナノ秒の時間域における蛍光量

D_1 : 5-9ナノ秒の時間域における蛍光量

$$\Delta t = 4 \text{ ns}$$

$$\sigma = \tau \times (-\ln(D_1/D_0)) / (1/D_0 + 1/D_1)^{1/2}$$

2つの蛍光減衰カーブの差（ここでは、ターゲット核酸が含まれていない試料（コントロール）の減衰カーブとの差）の検定は、 $\Delta\tau/\sigma_{\Delta\tau}$ をパラメータとして行う。

ここで、

$$\Delta\tau \text{ (蛍光寿命の差)} = \tau \text{ (ターゲットDNAを含む試料)} - \tau \text{ (コントロール)}$$

$$\sigma_{\Delta\tau} = (\sigma \text{ (ターゲットDNAを含む試料)}^2 + \sigma \text{ (コントロール)}^2)^{1/2}$$

$\Delta\tau/\sigma_{\Delta\tau}$ は2つの蛍光減衰カーブの差の識別のS/Nをあらわしており、その値が大きいほど高精度でターゲットDNAの存在の検定が可能であることを意味している。

表 3

プローブ : BODIPY/CY5 (2 本鎖, n=12)

被検体 DNA / プローブ :	1%	3%	5%	20%
$\Delta \tau / \sigma_{\Delta \tau}$	7.09	12.10	17.14	36.02

蛍光スペクトル測定による被検体の検出法との比較

蛍光減衰カーブの測定にもとづく本方法は、従来の蛍光スペクトル変化の測定にもとづく方法と比較して、検出用プローブ過剰の条件での被検体の検出において、数十倍以上の高い検定精度をもつ。図 5 は、図 4 と同じ試料の蛍光スペクトル変化を示したものである。

蛍光スペクトルの変化の大きさは、Bodipy 493/503 の蛍光の極大波長 (517 nm) での蛍光強度 (I_d) と Cy5 の蛍光の極大波長 (667 nm) での蛍光強度 (I_a) との比率 I_a/I_d、または Bodipy の蛍光の波長域 (例えば 510-560 nm) での蛍光強度と Cy5 の蛍光強度の波長域 (例えば 650-700 nm) での蛍光強度の比率、によりあらわすことができる。このとき、2つの蛍光スペクトルの差の識別の S/N は $\Delta I / \sigma_{\Delta I}$ であらわされる。

$$\Delta I = I_a / I_b (\text{ターゲット DNA を含む試料}) - I_a / I_b (\text{コントロール})$$

$$\sigma_{\Delta I} = (\sigma(\text{ターゲット DNA を含む試料})^2 + \sigma(\text{コントロール})^2)^{1/2}$$

$$\sigma = (I_a / I_d) \times (1 / I_d + 1 / I_a)^{1/2}$$

表 4

プロープ : BODIPY/CY5 (2 本鎖, n=12)				
被検体 DNA / プロープ :	1%	3%	5%	20%
$\Delta (I_a/I_d) / \sigma_{\Delta r}$, ピーク比	0.18	0.51	0.78	3.05
$\Delta (I_a/I_d) / \sigma_{\Delta r}$, 積分比	1.08	3.16	4.45	16.83

表 3 と表 4 の数値の比較から、蛍光減衰カーブを利用する検出方法（時間分解法）が、蛍光スペクトルを用いる方法と比べて、検出用プロープが被検体に対して過剰に存在する試料においては大きな優位性をもつことがわかる。特に、被検体に対して検出用プロープがより過剰になるにしたがって、時間分解法の優位性がより大きくなることがわかる。

被検体が RNA であるときにも本検出用プロープおよび本検出方法は適用可能である。

図 3 6 は、本発明に係わる種々の検出用プロープおよび検出方法を用いて RNA を検出した一例である。被検体が DNA である図 4 の結果と同様に、検出用プロープが被検体である RNA に対して過剰に存在している試料においても、RNA の存在量に対応して蛍光減衰カーブが遅くなっていくことがわかる（詳細は実施例の項参照）。

検出用プロープのオリゴヌクレオチド部がホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドである場合にも本検出用プロープおよび本検出方法は有効である。

図 3 8 は、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド（S-オリゴ）を検出用プロープとして用い、RNA を検出した一例を示す。図 4、図 3 6 の結果と同様

に、検出用プローブが被検体であるRNAに対して過剰に存在している試料においても、RNAの存在量に対応して蛍光減衰カーブが遅くなっていくことがわかる（詳細は実施例の項参照）。

本発明に係わるプローブの応用

本発明に係わる検出用プローブおよびこれを用いた検出方法が検出可能とするものは、被検体たる核酸の検出に限定されるものではない。例えば、核酸の一次構造上の変化（核酸の組込み、逆位、欠失など）を高感度で精度よく検出することも可能である。

例えば、DNAの特定部位への他のDNA断片の組み込みを検出するときには、図6Aに示されるように、DNA上で2つのプローブがハイブリダイズする位置を、DNA断片が組み込まれる部位の両側とする。DNA断片が組み込まれていないときには、2つのプローブは隣接してハイブリダイズしているためエネルギー移動がおきるが、組み込みがおけると2つのプローブは離れた部位にハイブリダイズすることになるためエネルギー移動効率が低下し、蛍光減衰カーブが変化する。また、図6Bに示されるように、一方のプローブとして、組み込まれるDNA断片にハイブリダイズするものを使用すると、組み込みがおけると2つのプローブが隣接してハイブリダイズし、エネルギー移動がおきる。DNAの特定部位への他のDNA断片の組み込みは、遺伝子のクローニングの操作において、ベクターに目的のDNA断片を組み込むときなどに利用されるが、本発明に係わる検出用プローブおよび検出方法を使用すれば、試料に検出用プローブを加えた後に、未結合プローブの分離や洗浄の操作を必要としないで、組み込みがおこなわれていることを簡便に検出することが可能である。

また、外来遺伝子をベクターに組み込むときに、その方向性が問題となることがある。図7に示されるように、組み込むDNA断片の一方の端に一方のプローブがハイブリダイズするように設定すると、ある方向に組み込まれたとき（図7

上、順方向とする)にはエネルギー移動がおこり、逆の方向に組み込まれたとき(図7下、逆方向)にはエネルギー移動がおこらない。

また、ある大きさのDNA断片が取り除かれることがある(欠失)。ある種の遺伝子疾患では、特定の部位のDNA断片の欠失が遺伝子病の原因となっている。また、細胞の核のなかにおいて、スプライシング反応によりメッセンジャーRNAがつくられるときには、特定部位のRNA断片(イントロン)が取り除かれている。図8に示されるように、取り除かれる核酸の断片に一方のプロープがハイブリダイズするように設定すれば、これらの反応を検出することが可能である。

実施例

1. 検出用プロープ

種々の蛍光色素で標識された種々のオリゴDNAを合成し、これらを被検体であるDNAにハイブリダイズさせた。ハイブリッド体を分離精製した後、蛍光スペクトルおよび蛍光減衰カーブを測定した。

(1) プロープの合成

以下の塩基配列をもつオリゴDNAを、DNA/RNAシンセサイザー(Perkin Elmer: Model 394 または Perseptive: Model 18909)を用いて、 β シアノエチルアミダイト法により合成した。

N1: 5' - GCTATGACCATGXTTAC - 3'

N2: 5' - GCTATGACCAXGATTAC - 3'

N3: 5' - GCTATGACXATGATTAC - 3'

N4: 5' - GCTATGAXCATGATTAC - 3'

N5: 5' - GCTATGXCCATGATTAC - 3'

N6: 5' - GCTAXGACCATGATTAC - 3'

N7: 5' - GCXATGACCATGATTAC - 3'

上記プローブN1-N7で、Xは Uni-Link AminoModifier (CLONTECH Laboratories Inc. Code No.CL5190-1) を示す。

N8 : 5' -AXCGCGCAATTAAACCC-3'

N9 : 5' -AGXGCGCAATTAAACCC-3'

N10 : 5' -AGCGXGCAATTAAACCC-3'

上記プローブN8-N10で、Xは Uni-Link AminoModifierを示す。

N11 : 5' -XAGCGCGCAATTAAACCC-3'

上記プローブN11で、Xは、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイト (TFAcヘキサノールアミンリンカー、パーキンエルマージャパン : Cat No.400808) を示す。

N12 : 5' -XCCATGATTAC-3'

N13 : 5' -XGACCATGATTAC-3'

N14 : 5' -XTGACCATGATTAC-3'

N15 : 5' -XTATGACCATGATTAC-3'

N16 : 5' -XGCTATGACCATGATTAC-3'

N17 : 5' -GCTATGACCATGATTACX-3'

上記プローブN12-N17で、Xは、TFAcヘキサノールアミンリンカーを示す。

それぞれ得られた反応物を、イオン交換高速液体クロマトグラフで分離し、主ピークを分取した。イオン交換高速液体クロマトグラフに用いた条件は、東ソー社製カラム、TSK-GEL DEAE-2WS (4.6mm内径x250mm全長) を使用し、流速0.8ml/分、温度40度、移動相はHCOOHNH₄、勾配-20%CH₃CNであり、260nmの吸収で検出した。HCOOHNH₄、勾配は、A液 : 0.2M HCOOHNH₄、B液 : 1M HCOOHNH₄の2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B液の比率 : 35%-85%/20分の

勾配を使用した。

分取した液を脱塩した後、凍結乾燥した。

(オリゴDNAの Bodipy 493/503 標識)

オリゴDNA (N8、N9、N10、N11) を Bodipy 493/503 色素で標識した。

NHSS (N-Hydroxysulfosuccinimide, Sodium Salt) 2.5 mg を 30 μ l の滅菌水に、EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 5 mg を 50 μ l の滅菌水にそれぞれ溶解した。これらと、Bodipy 493/503 プロピオン酸 1 mg を 50 μ l DMF に溶解したものを混合し、室温で30分間反応させた。得られた溶液を、乾固したオリゴDNAを0.5 M Na_2CO_3 / NaHCO_3 緩衝液 (pH 9.3) 300 μ l に溶解したものと混合し、遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAK C18 (6 mm 内径 \times 250 mm 全長) を使用し、流速 1 ml / 分、温度 40 度、移動相は CH_3CN 勾配 - 5 mM TEAA、であり、260 nm の吸収で検出した。 CH_3CN 勾配は、A 液 : 5% CH_3CN 、B 液 : 40% CH_3CN の2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B 液の比率 : 30% - 80% / 20 分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260 nm の吸収と蛍光色素の吸収 (493 nm) を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

BP0 (N11 の Bodipy493/503 標識体) : 5' - XAGCGCGCAATTA
ACCC - 3'

BP1 (N8 の Bodipy493/503 標識体) : 5' - AXCGCGCAATTAA
CCC - 3'

BP 2 (N 9 の Bodipy493/503 標識体) : 5' - AGXGCGCAATTA
ACCC - 3'

BP 4 (N 10 の Bodipy493/503 標識体) : 5' - AGCGXGCAATTAA
CCC - 3'

上記で X は、リンカーを介して Bodipy 493/503 が結合したものである。

(オリゴDNAの FITC 標識)

オリゴDNA (N 11、N 12、N 13、N 14、N 15、N 17) を FITC (fluorescein isothiocyanate) (Molecular Probes) 色素で標識した。

FITC 1.5 mg を DMF 150 μ l に溶解した。これを、乾固したオリゴDNA を 0.5 M Na_2CO_3 / NaHCO_3 緩衝液 (pH 9.3) 300 μ l に溶解した溶液と混合し、遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAK C18 (6 mm 内径 \times 250 mm 全長) を使用し、流速 1 ml / 分、温度 40 度、移動相は CH_3CN 勾配 - 5 mM TEAA、であり、260 nm の吸収で検出した。 CH_3CN 勾配は、A 液 : 5% CH_3CN 、B 液 : 40% CH_3CN の 2 つの溶液の混合比を変えることで作成した。B 液の比率 : 15% - 65% / 20 分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260 nm の吸収と蛍光色素の吸収 (495 nm) を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

5F (N 11 の FITC 標識体) : 5' - XAGCGCGCAATTAAACC
C - 3'

5F 10 (N 12 の FITC 標識体) : 5' - XCCATGATTAC - 3'

5F 12 (N 13 の FITC 標識体) : 5' - XGACCATGATTAC -

3'

5 F 1 3 (N 1 4 の F I T C 標識体) : 5' - X T G A C C A T G A T T A C
- 3'

5 F 1 5 (N 1 5 の F I T C 標識体) : 5' - X T A T G A C C A T G A T T
A C - 3'

3 F (N 1 7 の F I T C 標識体) : 5' - G C T A T G A C C A T G A T T A
C X - 3'

上記で X は、リンカーを介して F I T C が結合したものである。

(オリゴDNAの X R I T C 標識)

オリゴDNA (N 1 1) を X R I T C (rhodamine X isothiocyanate) (Mol
ecular Probes) 色素で標識した。

X R I T C 1.5 mg を D M F 150 μ l に溶解した。これを、乾固したオリ
ゴDNA を 0.5 M Na_2CO_3 / NaHCO_3 緩衝液 (pH 9.3) 300 μ l
に溶解した溶液と混合し、遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反
応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。
逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL
L PAK C18 (6 mm 内径 \times 250 mm 全長) を使用し、流速 1 ml / 分、
温度 40 度、移動相は CH_3CN 勾配 - 5 mM TEAA、であり、260 nm の
吸収で検出した。 CH_3CN 勾配は、A 液 : 5% CH_3CN 、B 液 : 40% CH_3
 CN の 2 つの溶液の混合比を変えることで作成した。B 液の比率 : 30% - 80
% / 20 分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、26
0 nm の吸収と蛍光色素の吸収 (570 nm) を確認した。これらを凍結乾燥し
て保存した。

5 R 1 6 (N 1 1 の X R I T C 標識体) : 5' - X A G C G C G C A A T T A A

CCC-3'

上記で Xは、リンカーを介してXRITCが結合したものである。

(オリゴDNAの Cy 3 標識)

オリゴDNA (N11) を Cy 3 色素で標識した。

1チューブのCy 3 色素 (Amersham, FluoroLink Cat.No. PA23001) を100 μ lの滅菌水に溶解した。これを、乾固したオリゴDNAを0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液 (pH 9.3) 200 μ lに溶解した溶液と混合し、遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAK C18 (6mm内径 \times 250mm全長) を使用し、流速1ml/分、温度40度、移動相はCH₃CN勾配-5mMTEAA、であり、260nmの吸収で検出した。CH₃CN勾配は、A液: 5%CH₃CN、B液: 40%CH₃CNの2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B液の比率: 15%-60%/20分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260nmの吸収と蛍光色素の吸収 (550nm) を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

5Cy 3 (N11のCy 3 標識体) : 5' -XAGCGCGCAATTAAACCC-3'

上記で Xは、リンカーを介してCy 3 が結合したものである。

(オリゴDNAの Cy 3.5 標識)

オリゴDNA (N3、N6、N16) を Cy 3.5 色素で標識した。

1チューブのCy 3.5 色素 (Amersham, FluoroLink Cat.No. PA23501) を100 μ lの滅菌水に溶解した。これを、乾固したオリゴDNAを0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液 (pH 9.3) 200 μ lに溶解した溶液と混合し、

遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAK C18 (6 mm 内径 x 250 mm 全長) を使用し、流速 1 ml/分、温度 40 度、移動相は CH₃CN 勾配 - 5 mM TEAA、であり、260 nm の吸収で検出した。CH₃CN 勾配は、A 液 : 5% CH₃CN、B 液 : 40% CH₃CN の 2 つの溶液の混合比を変えることで作成した。B 液の比率 : 15% - 60% / 20 分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260 nm の吸収と蛍光色素の吸収 (581 nm) を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

Cy 358 (N3 の Cy 3.5 標識体) : 5' - GCTATGACXATGATTAC - 3'

Cy 3512 (N6 の Cy 3.5 標識体) : 5' - GCTAXGACCATGATTAC - 3'

Cy 3516 (N16 の Cy 3.5 標識体) : 5' - XGCTATGACCATGATTAC - 3'

上記で X は、リンカーを介して Cy 3.5 が結合したものである。

(オリゴ DNA の Cy 5 標識)

オリゴ DNA (N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N11、N17) を Cy 5 色素で標識した。

1 チューブの Cy 5 色素 (Amersham, FluoroLink Cat.No. PA25001) を 100 μ l の滅菌水に溶解した。これを、乾固したオリゴ DNA を 0.5 M Na₂CO₃ / NaHCO₃ 緩衝液 (pH 9.3) 200 μ l に溶解した溶液と混合し、遮光して一晩反応させた。反応液をゲル濾過して未反応の色素を除去した後、逆相高速液体クロマトグラフにより反応物を精製した。逆相高速液体クロマトグラフに

用いた条件は、資生堂社製カラム、CAPCELL PAK C18 (6mm内径 x 250mm全長) を使用し、流速1ml/分、温度40度、移動相はCH₃CN勾配-5mMTEAA、であり、260nmの吸収で検出した。CH₃CN勾配は、A液: 5%CH₃CN、B液: 40%CH₃CNの2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B液の比率: 15%-60%/20分の勾配を使用した。分取したピークの吸収スペクトルを測定し、260nmの吸収と蛍光色素の吸収(649nm)を確認した。これらを凍結乾燥して保存した。

Cy 5 4 (N1のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGACCATGXTTA
C-3'

Cy 5 6 (N2のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGACCAXGATTA
C-3'

Cy 5 8 (N3のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGACXATGATTA
C-3'

Cy 5 9 (N4のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGAXCATGATTA
C-3'

Cy 5 10 (N5のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGXCCATGATT
AC-3'

Cy 5 12 (N6のCy 5 標識体) : 5' -GCTAXGACCATGATT
AC-3'

Cy 5 14 (N7のCy 5 標識体) : 5' -GCXATGACCATGATT
AC-3'

5 Cy 5 (N11のCy 5 標識体) : 5' -XAGCGCGCAATTAAAC
CC-3'

3 Cy 5 (N17のCy 5 標識体) : 5' -GCTATGACCATGATT
ACX-3'

上記で Xは、リンカーを介してCy 5が結合したものである。

(2) 被検体DNAの合成

以下の塩基配列をもつオリゴDNAを、DNA/RNAシンセサイザー (Perkin Elmer: Model 394 または Perseptive: Model 18909) を用いて、 β シアノエチルアミダイト法により合成した。

T0: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTGTAATCATGGTCA
TAGC-3'

T2: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGTAATCATGGT
CATAGC-3'

T4: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG
GTCATAGC-3'

T6: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAGTAATCA
TGGTCATAGC-3'

T8: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAAAGTAAT
CATGGTCATAGC-3'

T10: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAAAAGT
AATCATGGTCATAGC-3'

T12: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAAAAAA
GTAATCATGGTCATAGC-3'

T15: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAAAAAA
AAAGTAATCATGGTCATAGC-3'

T20: 5' -GGGTTAATTGCGCGCTTGGCAAAAAAA
AAAAAAAGTAATCATGGTCATAGC-3'

それぞれ得られた反応物を、イオン交換高速液体クロマトグラフで分離し、主ピークを分取した。イオン交換高速液体クロマトグラフに用いた条件は、東ソー社製カラム、TSK-GEL DEAE-2WS (4.6mm内径×250mm全長)を使用し、流速0.8ml/分、温度40度、移動相はHCOOHNH₄勾配-20%CH₃CNであり、260nmの吸収で検出した。HCOOHNH₄勾配は、A液:0.2M HCOOHNH₄、B液:1M HCOOHNH₄の2つの溶液の混合比を変えることで作成した。B液の比率:35%-85%/20分の勾配を使用した。

分取した液を脱塩した後、凍結乾燥して保存した。

(3) 検出用プローブと被検体DNAとのハイブリッド体の形成、および高速液体クロマトグラフによるハイブリッド体の分離

ドナープローブとアクセプタープローブからなる一組の検出用プローブ 40 pmol (ドナープローブ、アクセプタープローブ各々 40 pmol) と被検体DNA 40 pmol とを、10mM Tris-HCl pH7.4, 140 mM NaCl 10 μl 中で室温で5分間混合して、ハイブリダイゼーションさせた。その後、イオン交換高速液体クロマトグラフ (イオン交換HPLC) により、ハイブリッド体を分離した。イオン交換高速液体クロマトグラフに用いた条件は、東ソー社製カラム、TSK-GEL DEAE-NPRを使用し、流速1ml/分、室温、移動相はNaCl勾配-20mM Tris-HCl (pH9.5) であり、260nmの吸収および蛍光強度

(励起波長:ドナー色素の吸収極大の波長、蛍光検出の波長:アクセプター色素の蛍光の極大波長)で検出した。NaCl勾配は、A液:20mM Tris-HCl (pH9.5)、B液:20mM Tris-HCl (pH9.5)、1M NaClの2つの溶液の混合比を変えることで作成し、以下に示す条件を使用した。

0 - 2分

B液の比率 25%-45%のグラジエント

2 - 1 2 分	B液の比率 45% - 55%のグラジエント
1 2 - 1 3 分	B液の比率 55% - 100%のグラジエント

クロマトグラフにおいて、強い蛍光があらわれるピークをハイブリッド体のピークと同定した（エネルギー移動がおきたときにのみ強い蛍光が観測される）。強い蛍光をもつピークは、個々のプローブの流出位置よりも、クロマトグラフ上で長い保持時間をもつ位置に流出した。

取得したHPLC分画の蛍光スペクトルを測定し（蛍光分光光度計：日立製作所、F-4500）、エネルギー移動がおきていることを確認した。

（４）ハイブリッド体の蛍光減衰カーブの測定

高速液体クロマトグラフで分離精製したハイブリッド体の蛍光減衰カーブを測定した。

ピコ秒蛍光寿命測定装置 C4780 （浜松ホトニクス）

励起光源

1 アルゴンレーザー励起チタンサファイアレーザー（スペクトラフィジックス）

アルゴンイオンレーザー モデル2080

モードロックチタンサファイアレーザー TSUNAMI

フリークエンシーダブラー／パルスセクター モデル3980

2 窒素-色素レーザー（レーザーホトニクス）

窒素レーザー モデルLN1200

色素 COUMARIN307

（a）ドナー蛍光色素を Bodipy 493/503、アクセプター蛍光色素を Cy5 とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を

二本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を n = 4、8、10、12、14、としたときの、アクセプターの蛍光波長域 (650-700 nm) の蛍光減衰カーブ。

Bodipy 493/503 はドナープローブにおいて 5' 末端の位置に、Cy 5 はアクセプタープローブにおいて中間部に標識されている。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナー-プローブ	アクセプター-プローブ	被検体 DNA	HPLC での溶出時間 (分)
BP0	Cy 5 4	T0	5.89-6.40
BP0	Cy 5 8	T0	5.82-6.14
BP0	Cy 5 10	T0	5.90-6.23
BP0	Cy 5 12	T0	5.97-6.40
BP0	Cy 5 14	T0	6.03-6.49

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体	2つの蛍光色素の塩基間数 (n)	蛍光減衰カーブ
BP0/Cy 5 4/T0	n = 4	図 9
BP0/Cy 5 8/T0	n = 8	図 10
BP0/Cy 5 10/T0	n = 10	図 11
BP0/Cy 5 12/T0	n = 12	図 12
BP0/Cy 5 14/T0	n = 14	図 13
BP0/Cy 5 10 (2種類のプローブを混合したもの)		図 14

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm (図 9-図 13)

窒素-色素レーザー 490 nm (図 14)

蛍光の測定波長域： 650-700 nm

「BP0/Cy 5 10」は、BP0 40 pmol と Cy 5 10 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH7.4、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料である。

(b) ドナー蛍光色素を Bodipy 493/503、アクセプター蛍光色素を Cy 5 とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を $n=10$ とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の構造を二本鎖と一本鎖の混合としたときの、アクセプターの蛍光波長域 (650–700 nm) の蛍光減衰カーブ。Bodipy 493/503 はドナープローブにおいて 5' 末端の位置に、Cy 5 はアクセプタープローブにおいて中間部に標識されている。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体 DNA	HPLC での溶出時間 (分)
BP0	Cy 5 10	T0	6.01–6.51
BP0	Cy 5 8	T2	5.63–6.24
BP0	Cy 5 6	T4	5.55–6.24
BP0	Cy 5 4	T6	5.99–6.42

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体	一本鎖構造をとる塩基数 (gap)	蛍光減衰カーブ
BP0 / Cy 5 10 / T0	0	図 15
BP0 / Cy 5 8 / T2	2	図 16
BP0 / Cy 5 6 / T4	4	図 17
BP0 / Cy 5 4 / T6	6	図 18
BP0 / Cy 5 10 (2 種類のプロブを混合したもの)		図 19

励起光: チタンサファイアレーザー 480 nm (図 19)

窒素-色素レーザー 490 nm (図 15–図 18)

蛍光の測定波長域: 650–700 nm

「BP0 / Cy 5 10」は、BP0 40 pmol と Cy 5 10 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料である。

(c) ドナー蛍光色素を Bodipy 493/503、アクセプター蛍光色素を Cy 5 とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を $n=10$ とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している 2 つのヌクレオチド間の構造を二本鎖とし、ハイブリッド体において一方の蛍光色素 (ここでは Bodipy 493/503) の標識位置がハイブリッド体における「切れ目 (2 つのプロープが隣り合う部位)」の位置に対して、0 (プロープの末端部位)、1、2、4 塩基離れた位置になるときのアクセプターの蛍光波長域 (650–700 nm) の蛍光減衰カーブ。Bodipy 493/503 はドナープロープにおいて 5' 末端の位置 (BP 0) または中間部 (BP 1、BP 2、BP 4) に、Cy 5 はアクセプタープロープにおいて中間部に標識されている。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープロープ	アクセプタープロープ	被検体 DNA	HPLC での溶出時間 (分)
BP 0	Cy 5 10	T 0	6.01–6.51
BP 1	Cy 5 9	T 0	5.52–6.12
BP 2	Cy 5 8	T 0	5.45–5.99
BP 4	Cy 5 6	T 0	5.46–5.91

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体	切れ目の位置からの塩基数	蛍光減衰カーブ
BP 0 / Cy 5 10 / T 0	0	図 2 0
BP 1 / Cy 5 9 / T 0	1	図 2 1
BP 2 / Cy 5 8 / T 0	2	図 2 2
BP 4 / Cy 5 6 / T 0	4	図 2 3
BP 0 / Cy 5 10 (2 種類のプロープを混合したもの)		図 2 4

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm (図 2 4)

窒素-色素レーザー 490 nm (図20-図23)

蛍光の測定波長域: 650-700 nm

BP0/Cy510」は、BP0 40 pmol と Cy510 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料である。

(d) ドナー蛍光色素を Bodipy 493/503、アクセプター蛍光色素を Cy3.5 とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を二本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を n=8、12、16、としたときの、アクセプターの蛍光波長域 (600-650 nm) の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体DNA	HPLCでの溶出時間 (分)
BP0	Cy358	T0	5.56-5.93
BP0	Cy3512	T0	5.74-6.35
BP0	Cy3516	T0	5.65-5.85

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体	2つの蛍光色素の塩基間数 (n)	蛍光減衰カーブ
BP0/Cy358/T0	n=4	図25
BP0/Cy3512/T0	n=12	図26
BP0/Cy3516/T0	n=16	図27
BP0/Cy3512 (2種類のプロブを混合したもの)		図28

励起光: チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域: 600-650 nm

「BP0/Cy3512」は、BP0 40 pmol と Cy3512 40 pmol を、20

mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料である。

(e) ドナー蛍光色素をF I T C、アクセプター蛍光色素をCy 5とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を二本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数(n)をn=10、12としたときの、アクセプターの蛍光波長域(650-700 nm)の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体DNA	HPLCでの溶出時間(分)
5 F 1 0	5 C y 5	T O	8.12-8.89
5 F 1 2	5 C y 5	T O	6.27-6.73

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体、5 F 1 0 / 5 C y 5 / T O、5 F 1 2 / 5 C y 5 / T Oの蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして「5 F 1 0 40 pmol と5 C y 5 40 pmolを、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れは認められるが顕著ではない(図示はされていない)。

励起光：窒素-色素レーザー 490 nm

蛍光の測定波長域： 650-700 nm

(f) ドナー蛍光色素をF I T C、アクセプター蛍光色素をCy 5とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を一本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数(n)をn=12、15、20としたときの、アクセプターの蛍光波長域(650-700 nm)の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナー蛍光色素	アクセプター蛍光色素	被検体DNA	HPLCでの溶出時間 (分)
5 F	3 Cy 5	T 1 2	8.96-9.52
5 F	3 Cy 5	T 1 5	8.76-9.49
5 F	3 Cy 5	T 2 0	8.87-9.26

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体、5 F / 3 Cy 5 / T 1 2、5 F / 3 Cy 5 / T 1 5、5 F / 3 Cy 5 / T 2 0、の蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして「5 F 40 pmol と 3 Cy 5 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れはあまり認められなかった(図示はされていない)。

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域： 650-700 nm

(g) ドナー蛍光色素をFITC、アクセプター蛍光色素をCy3とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を一本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数(n)をn=12、15、20としたときの、アクセプターの蛍光波長域(580-630 nm)の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナー蛍光色素	アクセプター蛍光色素	被検体DNA	HPLCでの溶出時間 (分)
3 F	5 Cy 3	T 1 2	7.45-8.29
3 F	5 Cy 3	T 1 5	7.22-8.47

3 F 5 C y 3 T 2 0 7.18-8.07

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体、3 F / 5 C y 3 / T 1 2、3 F / 5 C y 3 / T 1 5、3 F / 5 C y 3 / T 2 0、の蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして「3 F 40 pmol と 5 C y 3 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れはあまり認められなかった(図示はされていない)。

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域： 580-630 nm

(h) ドナー蛍光色素を F I T C、アクセプター蛍光色素を C y 3 とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を二本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を n = 10、13、15、としたときの、アクセプターの蛍光波長域 (580-630 nm) の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体DNA	HPLCでの溶出時間 (分)
5 F 1 0	5 C y 3	T 0	7.54-7.75
5 F 1 3	5 C y 3	T 0	7.23-7.45
5 F 1 5	5 C y 3	T 0	7.24-7.76

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体、5 F 1 0 / 5 C y 3 / T 0、5 F / 5 C y 3 / T 0、5 F 1 5 / 5 C y 3 / T 0、の蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして

「5 F 1 0 40pmol と 5 C y 3 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れはあまり認められなかった(図示はされていない。)

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域： 580-630 nm

(i) ドナー蛍光色素を F I T C、アクセプター蛍光色素を X R I T C とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を二本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を $n = 15$ としたときの、アクセプターの蛍光波長域 (600-650 nm) の蛍光減衰カーブ。

高速液体クロマトグラフ (H P L C) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体DNA	HPLCの溶出時間 (分)
5 F 1 5	5 R 1 6	T 0	6.75-7.53

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ ハイブリッド体、5 F 1 5 / 5 R 1 6 / T 0 の蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして「5 F 1 5 40 pmol と 5 R 1 6 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れはあまり認められなかった(図示はされていない)。

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域： 600-650 nm

(j) ドナー蛍光色素を F I T C、アクセプター蛍光色素を X R I T C とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を一本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を $n = 4, 8, 1$

2、15、20、としたときの、アクセプターの蛍光波長域（600-650 nm）の蛍光減衰カーブ。

この試料については、高速液体クロマトグラフで分離することなく、プローブと被検体DNAを混合した試料において、蛍光減衰カーブを測定した。また、コントロールとして「3 F 40 pmol と 5 R 16 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ lに溶かした試料」の蛍光減衰カーブを測定した。ハイブリッド体形成にともなう蛍光減衰カーブの遅れはあまり認められなかった（図示はされていない）。

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm

蛍光の測定波長域： 600-650 nm

ドナープローブ アクセプタープローブ 被検体DNA

3 F	5 R 16	T 4
3 F	5 R 16	T 8
3 F	5 R 16	T 12
3 F	5 R 16	T 15
3 F	5 R 16	T 20

(k) ドナー蛍光色素を Bodipy 493/503、アクセプター蛍光色素を Cy 5 とし、ハイブリッド体における蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間の構造を一本鎖とし、ハイブリッド体における蛍光色素間の塩基数 (n) を n = 4、8、10、12、15、20、としたときの、アクセプターの蛍光波長域（650-700 nm）の蛍光減衰カーブ。

Bodipy 493/503 はドナープローブにおいて5' 末端の位置に、Cy 5 はアクセプタープローブにおいて3' 末端に標識されている。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) によるハイブリッド体の分離・精製

ドナープローブ アクセプタープローブ 被検体DNA HPLCでの溶出時間 (分)

BP0	3 Cy 5	T 4	7.02-7.59
BP0	3 Cy 5	T 8	7.37-8.10
BP0	3 Cy 5	T 10	8.74-9.32
BP0	3 Cy 5	T 12	8.91-9.22
BP0	3 Cy 5	T 15	8.83-9.18
BP0	3 Cy 5	T 20	8.69-9.17

ハイブリッド体の蛍光減衰カーブ

ハイブリッド体	2つの蛍光色素の塩基間数 (n)	蛍光減衰カーブ
BP0/3 Cy 5/T 4	n = 4	図 29
BP0/3 Cy 5/T 8	n = 8	図 30
BP0/3 Cy 5/T 10	n = 10	図 31
BP0/3 Cy 5/T 12	n = 12	図 32
BP0/3 Cy 5/T 15	n = 15	図 33
BP0/3 Cy 5/T 20	n = 20	図 34

(図 35 は、BP0 40 pmol と Cy 5 10 40 pmol を、20 mM Tris-HCl pH9.5、0.5M NaCl、200 μ l に溶かした試料の蛍光減衰カーブである。)

励起光：チタンサファイアレーザー 480 nm (図 29 - 図 34)

窒素-色素レーザー 490 nm (図 35)

蛍光の測定波長域： 650 - 700 nm

2. 検出用プローブが被検体に対して過剰に存在する試料における被検体の検出

(1) プローブの合成

以下の塩基配列をもつ蛍光標識オリゴDNAおよび蛍光標識ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド（S-オリゴ）を、前記「1. 検出用プローブ、（1）検出用プローブの合成」の項で示された手順にしたがって合成した。

Bodipy493/503標識オリゴDNA

BP0: 5' -XAGCGCGCAATTAACCC-3'

D1: 5' -XTCTAGTTGGTCTGTC-3'

上記BP0およびD1で、XはBodipy493/503が結合している位置をあらわす。

Bodipy493/503標識S-オリゴ

D2: 5' -XTCTAGTTGGTCTGTC-3'

上記D2で、Xは、Bodipy493/503が結合している位置をあらわす。

Cy5標識オリゴDNA

Cy512: 5' -GCTAXGACCATGATTAC-3'

A1: 5' -GCAXACTTCXTCATCT-3'

上記Cy512およびA1で、XはCy5が結合している位置をあらわす。

Cy5標識S-オリゴ

A2: 5' -GCAGAXCTTCATCT-3'

上記A2で、XはCy5の結合位置をあらわす。

（2）被検体DNA、被検体RNAの合成

以下の塩基配列をもつ被検体DNAおよび被検体RNAを、前記「1. 検出用プローブ、（2）被検体DNAの合成」の項で示された手順に準じて合成した。

被検体DNA (T0)

5' - GGGTTAATTGCGCGCTGTAATCATGGTCATAGC
- 3'

被検体RNA (RT1)

5' - GACAGACCAACUAGAAGAUGAGAAGUCUGC - 3'

(3) 測定用試料の作製および蛍光スペクトル、蛍光減衰カーブの測定

ドナープローブとアクセプタープローブからなる一組の検出用プローブ (ドナープローブ、アクセプタープローブ各々 200 pmol) と種々の量の被検体とを、200 μ l の 1x SSC 緩衝液 (15mM Na₃citrate pH7.0、150mM NaCl) 中で混合して、室温で10分間反応させた。その後、蛍光スペクトルおよび蛍光減衰カーブを測定した。

蛍光スペクトルの測定

蛍光分光光度計：日立製作所 F-4500

励起波長：490 nm

蛍光スペクトルの測定波長：500 - 750 nm

蛍光減衰カーブの測定

ピコ秒蛍光寿命測定装置 C4780 (浜松ホトニクス)

励起光源

1. アルゴンレーザー励起チタンサファイアレーザー (スペクトラフィジックス)

アルゴンイオンレーザー モデル2080

モードロックチタンサファイアレーザー TSUNAMI

フリークエンシーダブラー／パルスセクター モデル3980

2 窒素-色素レーザー (レーザーホトニクス)

窒素レーザー モデルLN1200

色素 COUMARIN307

蛍光を測定する波長域: 650-700 nm

(a) 検出用プローブとして、「Bodipy 493/503」をドナー蛍光色素とし、Cy 5をアクセプター蛍光色素として、ハイブリッド体を形成したときの蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間が二本鎖構造をとり、塩基間数が12 ($n=12$) であり、Bodipy493/503 がハイブリッド体の切れ目の位置にあるヌクレオチドに結合している」一組のオリゴDNAを使用し、被検体としてDNAを検出する。

ドナー γ - γ アセプター γ - γ 被検体 蛍光減衰カーブ 蛍光スペクトル
BP0 Cy512 T0 図4 図5

蛍光減衰カーブ (図4)

図中の番号	検出用 γ - γ の量	被検体DNAの量	量比 (被検体/ γ - γ)
1	200 pmol	0	0
2	200 pmol	2 pmol	1%
3	200 pmol	6 pmol	3%
4	200 pmol	10 pmol	5%
5	200 pmol	40 pmol	20%

図4から明らかなように、被検体DNAの量が増えるにつれて、減衰カーブは遅くなっていく。図中で1の減衰カーブ (被検体が含まれていない試料) と2の減衰カーブ (被検体DNAが含まれており、その存在量がプローブに対して1%

(モル比)である試料)は明瞭に識別可能であり、検出用プローブが被検体の100倍量過剰に存在していても、被検体の検出が可能である。

蛍光スペクトル (図5)

図中の番号	検出用プローブの量	被検体DNAの量	量比 (被検体/プローブ)
1	200 pmol	0	0
2	200 pmol	2 pmol	1%
3	200 pmol	6 pmol	3%
4	200 pmol	10 pmol	5%
5	200 pmol	40 pmol	20%

蛍光スペクトルでは1-3のスペクトルは実質的に識別不能であり、1と4のスペクトルの変化を識別することも困難である。

(b) 検出用プローブとして、「Bodipy 493/503」をドナー蛍光色素とし、Cy 5をアクセプター蛍光色素として、ハイブリッド体を形成したときの蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間が二本鎖構造をとり、Bodipy 493/503 がハイブリッド体の切れ目の位置にあるヌクレオチドに結合している」一組のオリゴDNAを使用し、被検体としてRNAを検出する。

2つの色素間の

ドナープローブ	アクセプタープローブ	被検体	塩基数	蛍光減衰カーブ	蛍光スペクトル
D 1	A 1	R T 1	n = 12	図 3 6	図 3 7

蛍光減衰カーブ (図36)

図中の番号	検出用プローブの量	被検体RNAの量	量比 (被検体/プローブ)
-------	-----------	----------	---------------

1	200 pmol	0	0
2	200 pmol	5 pmol	2.5%
3	200 pmol	10 pmol	5%
4	200 pmol	40 pmol	20%

蛍光スペクトル (図37)

図中の番号 検出用プローブの量 被検体RNAの量 量比 (被検体/プローブ)

1	200 pmol	0	0
2	200 pmol	5 pmol	2.5%
3	200 pmol	10 pmol	5%
4	200 pmol	40 pmol	20%

図36に示されているように、被検体RNAの量が増えるにつれて、減衰カーブはより遅くなる。図から、検出用プローブが被検体RNAよりも大過剰に存在している条件において、被検体RNAの検出が可能であることが明らかである。

(c) 検出用プローブとして、「Bodipy 493/503 をドナー蛍光色素とし、Cy 5をアクセプター蛍光色素として、ハイブリッド体を形成したときの蛍光色素が結合している2つのヌクレオチド間が二本鎖構造をとり、Bodipy 493/503 がハイブリッド体の切れ目の位置にあるヌクレオチドに結合している」一組のホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド使用し、被検体としてRNAを検出する。

ドナー-プローブ アクセプター-プローブ 被検体 2つの色素間の塩基数 蛍光減衰カーブ

D 2 A 2 R T 1 n = 10 図38

蛍光減衰カーブ (図38)

図中の番号	検出用プローブの量	被検体RNAの量	量比（被検体／プローブ）
1	200 pmol	0	0
2	200 pmol	5 pmol	2.5%
3	200 pmol	10 pmol	5%
4	200 pmol	40 pmol	20%

図38に示されているように、被検体RNAの量が増えるにつれて、減衰カーブはより遅くなる。図から、検出用プローブが被検体RNAよりも大過剰に存在している条件において、被検体RNAの検出が可能であることが明らかである。

産業上の利用可能性

本発明は、検体試料中に含まれる特定の塩基配列をもつDNAやRNAを、極めて簡便に、高精度・高感度に検出することを可能とする検出用プローブおよび検出方法を開発したものである。本発明の検出用プローブならびに検出方法が、遺伝子診断、細胞診断などに適用されると、大きな威力を発揮すると予想される。また、本発明の検出用プローブならびに検出方法を遺伝子のクローニングなど遺伝子工学分野の実験手法に適用することにより、当該分野の実験技術を大きく発展させることが期待される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGACCA TGNTTAC 17

配列番号 : 2

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGACCA NGATTAC 17

配列番号 : 3

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGACNA TGATTAC 17

配列番号 : 4

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGANCA TGATTAC 17

配列番号 : 5

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGNCCA TGATTAC 17

配列番号 : 6

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTANGACCA TGATTAC 17

配列番号 : 7

配列の長さ : 17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCNATGACCA TGATTAC 17

配列番号：8

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

ANCGCGCAAT TAACCC 16

配列番号：9

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AGNGCGCAAT TAACCC 16

配列番号：10

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

AGCGNGCAAT TAACCC 16

配列番号 : 11

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号 : 12

配列の長さ : 11

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NCCATGATTA C 11

配列番号 : 13

配列の長さ : 13

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NGACCATGAT TAC 13

配列番号 : 14

配列の長さ : 14

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NTGACCATGA TTAC 14

配列番号 : 15

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NTATGACCAT GATTAC 16

配列番号 : 16

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NGCTATGACC ATGATTAC 18

配列番号 : 17

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCTATGACCA TGATTACN 18

配列番号 : 18

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号 : 19

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

ANCGCGCAAT TAACCC 16

配列番号 : 20

配列の長さ : 16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AGNGCGCAAT TAACCC 16

配列番号：21

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AGCGNGCAAT TAACCC 16

配列番号：22

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号：23

配列の長さ：11

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NCCATGATTA C 11

配列番号：24

配列の長さ：13

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NGACCATGAT TAC 13

配列番号：25

配列の長さ：14

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NTGACCATGA TTAC 14

配列番号：26

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NTATGACCAT GATTAC 16

配列番号 : 27

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCTATGACCA TGATTACN 18

配列番号 : 28

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号 : 29

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号 : 30

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCTATGACNA TGATTAC 17

配列番号 : 31

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCTANGACCA TGATTAC 17

配列番号 : 32

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

NGCTATGACC ATGATTAC 18

配列番号 : 33

配列の長さ : 17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTATGACCA TGNTTAC 17

配列番号：34

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTATGACCA NGATTAC 17

配列番号：35

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTATGACNA TGATTAC 17

配列番号：36

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTATGANCA TGATTAC 17

配列番号：37

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTATGNCCA TGATTAC 17

配列番号：38

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCTANGACCA TGATTAC 17

配列番号：39

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCNATGACCA TGATTAC 17

配列番号 : 40

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号 : 41

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCTATGACCAT GATTACN 17

配列番号 : 42

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTGTAA TCATGGTCAT AGC 33

配列番号 : 43

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGT AATCATGGTC ATAGC 35

配列番号 : 44

配列の長さ : 37

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGC 37

配列番号 : 45

配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAGTAATCAT GGTCATAGC 39

配列番号 : 46

配列の長さ : 41

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAAAGTAATC ATGGTCATAG C 41

配列番号：47

配列の長さ：43

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAAAAAGTAA TCATGGTCAT AGC 43

配列番号：48

配列の長さ：45

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAAAAAAGT AATCATGGTC ATAGC 45

配列番号：49

配列の長さ：47

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAAAAAAAAA GTAATCATGG TCATAGC 47

配列番号：50

配列の長さ：51

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTTGGC AAAAAAAAAA AAAAAGTAATC ATGGTCATAG C 51

配列番号：51

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NAGCGCGCAA TTAACCC 17

配列番号：52

配列の長さ：16

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

NTCTAGTTGG TCTGTC 16

配列番号 : 53

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-オリゴ)

配列

NTCTAGTTGG TCTGTC 16

配列番号 : 54

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCTANGACCA TGATTAC 17

配列番号 : 55

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GCANACTTCN TCATCT 16

配列番号 : 56

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸

ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-オリゴ)

配列

GCAGANCTTC TCATCT 16

配列番号 : 57

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

GGGTTAATTG CGCGCTGTAA TCATGGTCAT AGC 33

配列番号 : 58

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : RNA

配列

GACAGACCAA CUAGAAGAUG AGAAGUCUGC 30

請求の範囲

1. 特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出するための1組の検出用プローブであって、

第1の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するドナープローブと、

第2の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するアクセプタープローブとからなり、

かつ、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブに基づく蛍光の減衰カーブが、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブと前記被検体とのハイブリッド体を形成する際に有意に変化する検出用プローブ。

2. 請求項1に記載の検出用プローブであって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブの前記第1の蛍光分子が結合するヌクレオチドと、前記アクセプタープローブの前記第2の蛍光分子が結合するヌクレオチド間が2本鎖構造である、前記検出用プローブ。

3. 請求項2に記載の検出用プローブであって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブが被検体に隣り合って連続してハイブリダイズする、前記検出用プローブ。

4. 請求項3に記載の検出用プローブであって、

前記第1の蛍光色素分子または前記第2の蛍光色素分子のいずれかが、被検体上で連続してハイブリダイズする前記1組の検出用プローブの隣り合う側の末端部である、前記検出用プローブ。

5. 請求項1に記載の検出用プローブであって、

前記1組の検出用プローブと被検体から形成されるハイブリッド体において、ドナープローブとアクセプタープローブが被検体にハイブリダイズして、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌ

クレオチド間の一部が2本鎖構造をとる、前記検出用プローブ。

6. 請求項1～5のいずれか1項に記載の検出用プローブであって、さらに、前記ハイブリッド体において、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が4～20である、前記検出用プローブ。

7. 請求項1～5のいずれか1項に記載の検出用プローブであって、前記ハイブリッド体において、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が8～16である、前記検出用プローブ。

8. 請求項1～7のいずれか1項に記載の検出用プローブであって、前記第1の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団またはフルオロセイン系蛍光団のいずれかを有し、かつ、前記第2の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団またはローダミン系蛍光団のいずれかを有する、前記検出用プローブ。

9. 請求項1～7のいずれか1項に記載の検出用プローブであって、さらに、前記第1の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団を有し、かつ前記第2の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団を有する、前記検出用プローブ。

10. 特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

(1) 第1の蛍光色素分子が結合し、前記のポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するドナープローブと、第2の蛍光色素分子が結合し、前記ポリヌクレオチド塩基配列の一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を有するアクセプタープローブとからなる1組の検出用プローブと、前記被検体からハイブリッド体を形成する第1のステップと、

(2) 前記ハイブリッド体の前記第2の蛍光色素に基づく蛍光波長域の蛍光強度の

減衰カーブを測定する第2のステップと、

(3) 前記1組の検出用プローブの前記第2の蛍光色素に基づく蛍光波長域の蛍光強度の減衰カーブを測定する第3のステップと、

(4) 前記第2および第3のステップで得られる蛍光減衰カーブの比較により前記ポリヌクレオチド塩基配列の存在を検出する第4のステップとからなる方法。

11. 請求項10に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブの前記第1の蛍光分子が結合するヌクレオチドと、前記アクセプタープローブの前記第2の蛍光分子が結合するヌクレオチド間が2本鎖構造である、前記方法。

12. 請求項10に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記ドナープローブと前記アクセプタープローブが被検体に隣り合って連続してハイブリダイズする、前記方法。

13. 請求項12に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記第1の蛍光色素分子または前記第2の蛍光色素分子のいずれかが、被検体上で連続してハイブリダイズする前記1組の検出用プローブの隣り合う側の末端部である、前記方法。

14. 請求項10に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記1組の検出用プローブと被検体から形成されるハイブリッド体において、ドナープローブとアクセプタープローブが被検体にハイブリダイズして、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の一部が2本鎖構造をとる、前記方法。

15. 請求項10～14のいずれか1項に記載の特定のポリヌクレオチド塩基

配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が4～20である、前記方法。

16. 請求項10～14のいずれか1項に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記ハイブリッド体において、前記第1の蛍光色素分子が結合するヌクレオチドと前記第2の蛍光色素分子が結合するヌクレオチド間の塩基数が8～16である、前記方法。

17. 請求項10～16のいずれか1項に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記第1の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団またはフルオロセイン系蛍光団のいずれかを有し、かつ、前記第2の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団またはローダミン系蛍光団のいずれかを有する、前記方法。

18. 請求項10～16のいずれか1項に記載の特定のポリヌクレオチド塩基配列を有する被検体を検出する方法であって、

前記第1の蛍光色素分子が、4, 4-ジフルオロ-4-ボロ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン系蛍光団を有し、かつ前記第2の蛍光分子が、インドシアニン系蛍光団を有する、前記方法。

図 1A

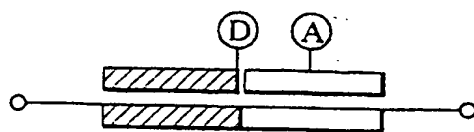


図 1B

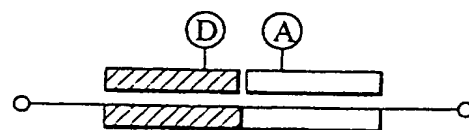


図 1C

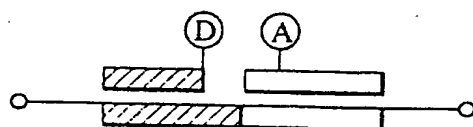


図 1D

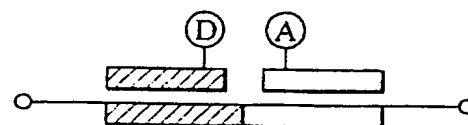


図 1E

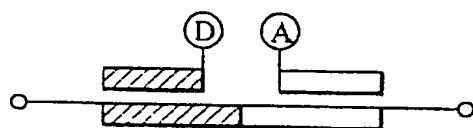


図 1F

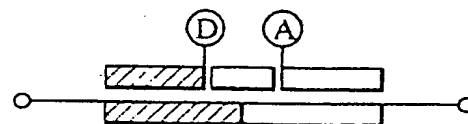


図2

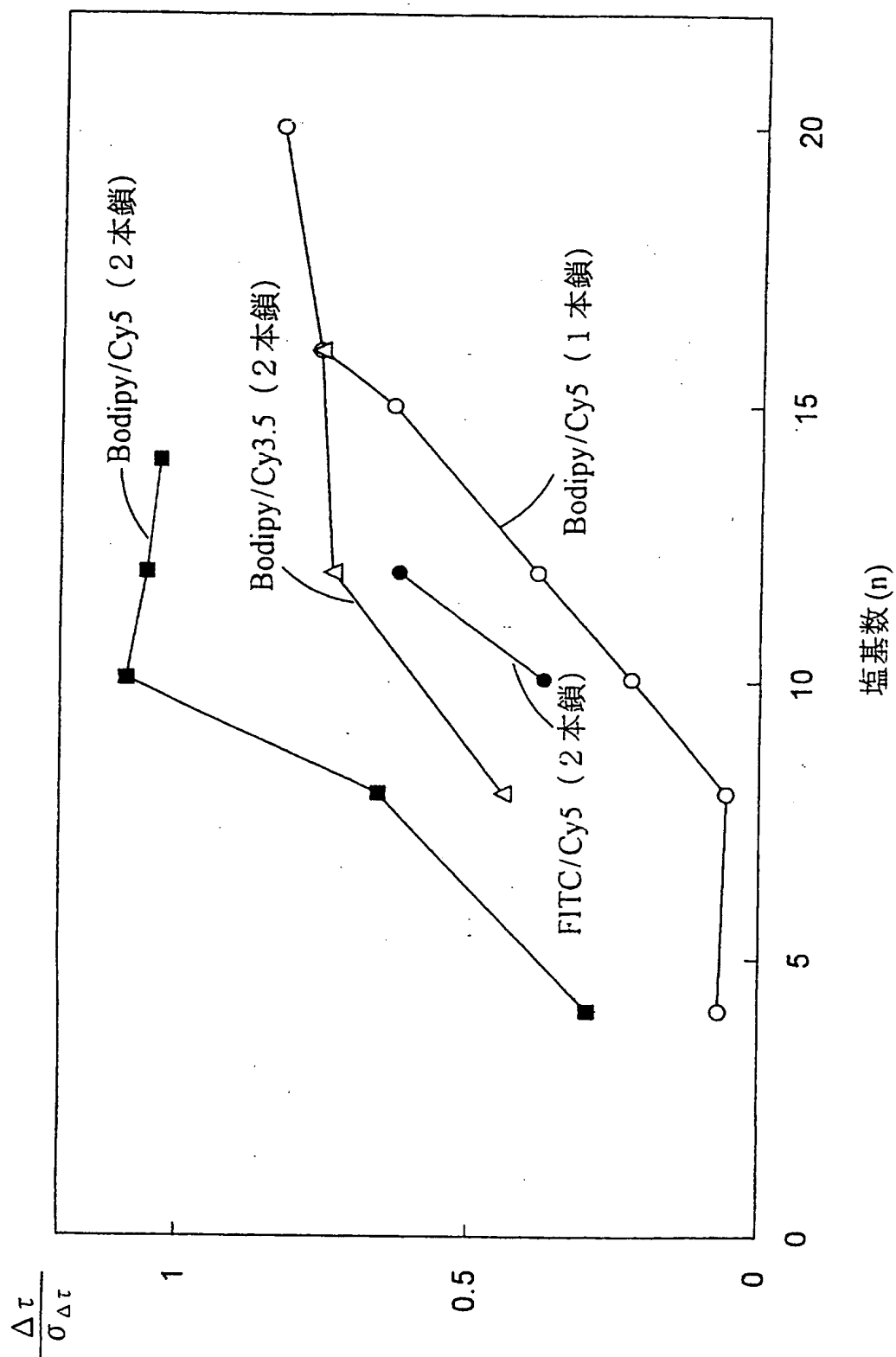


図3

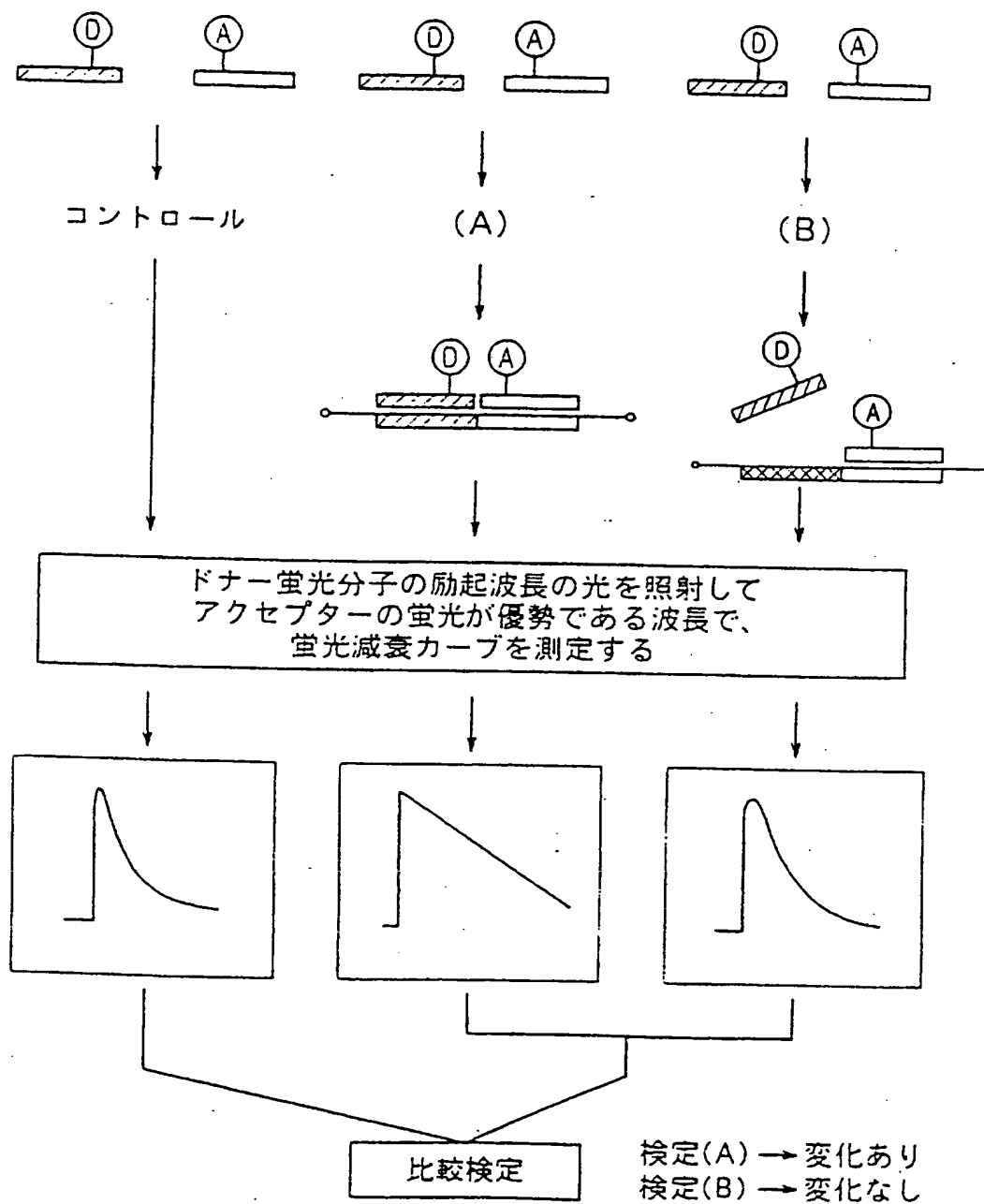


図4

Bodipy-P + Cy5-P + targetDNA

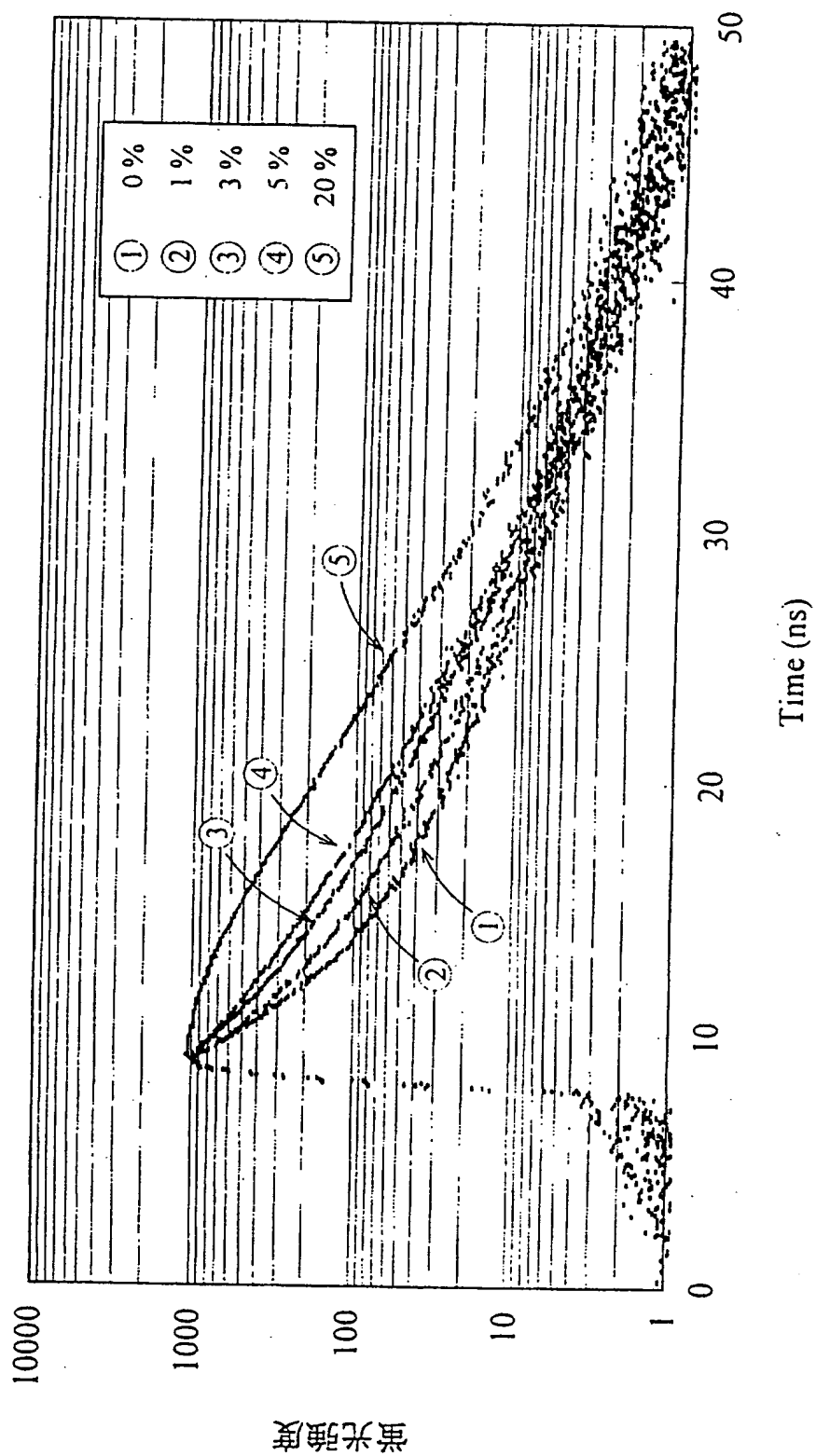
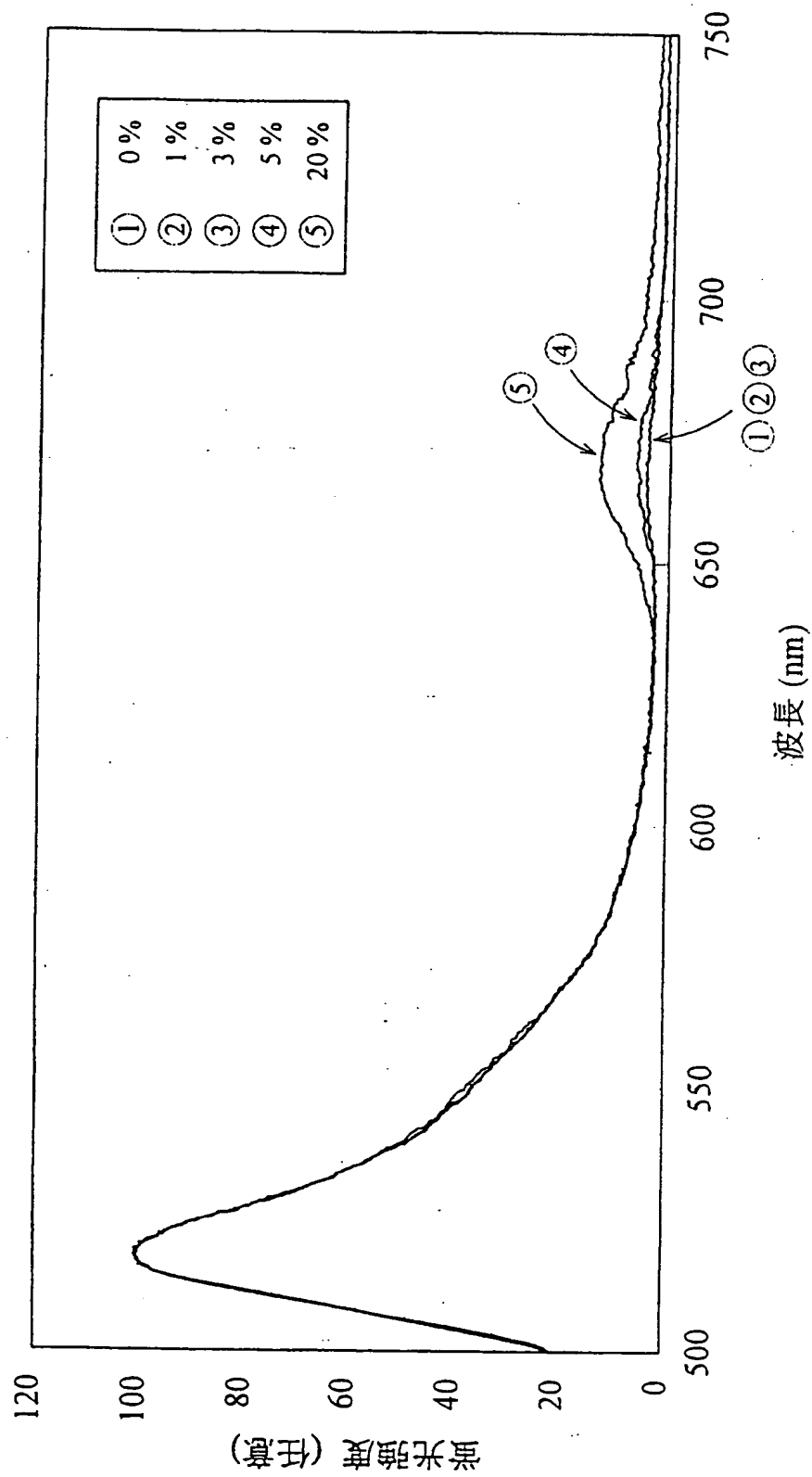


図5

Bodipy-P + Cy5-P + targetDNA



5/37

図 6A

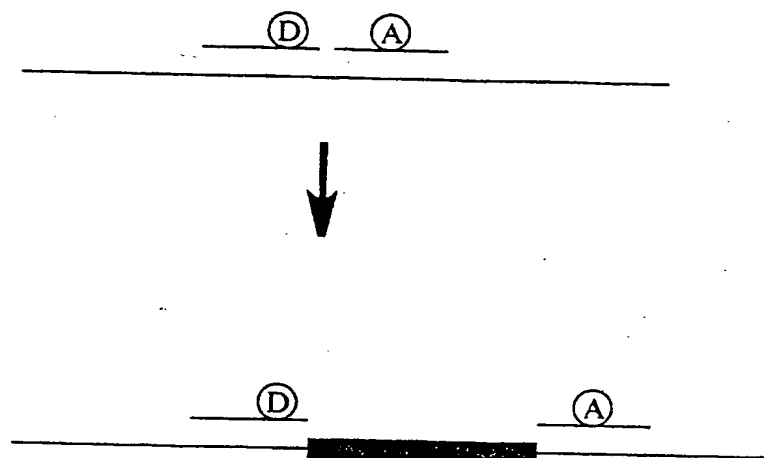


図 6B

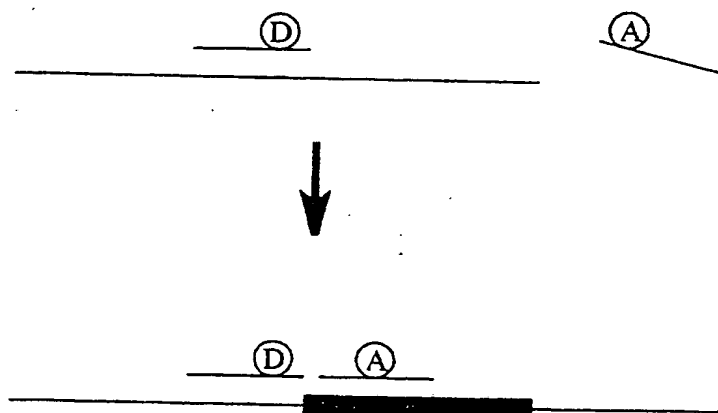


図 7

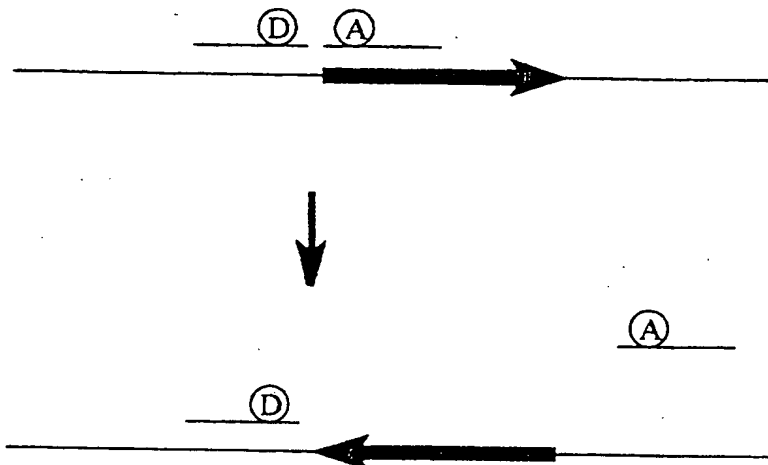


図 8

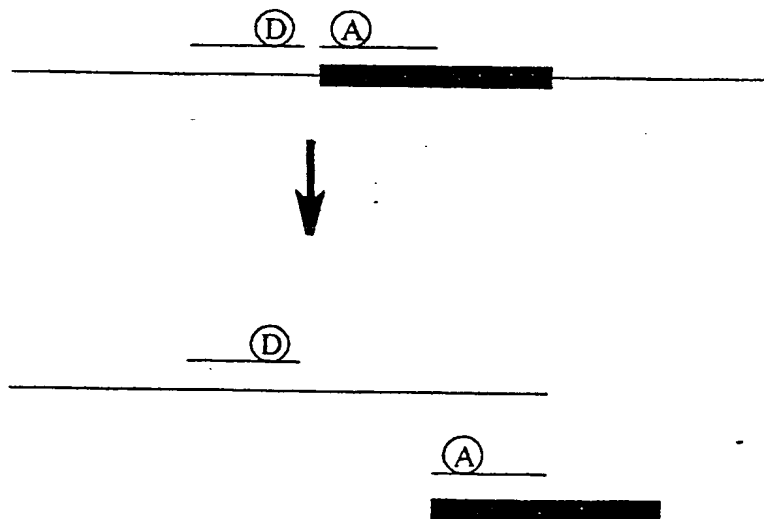


図9

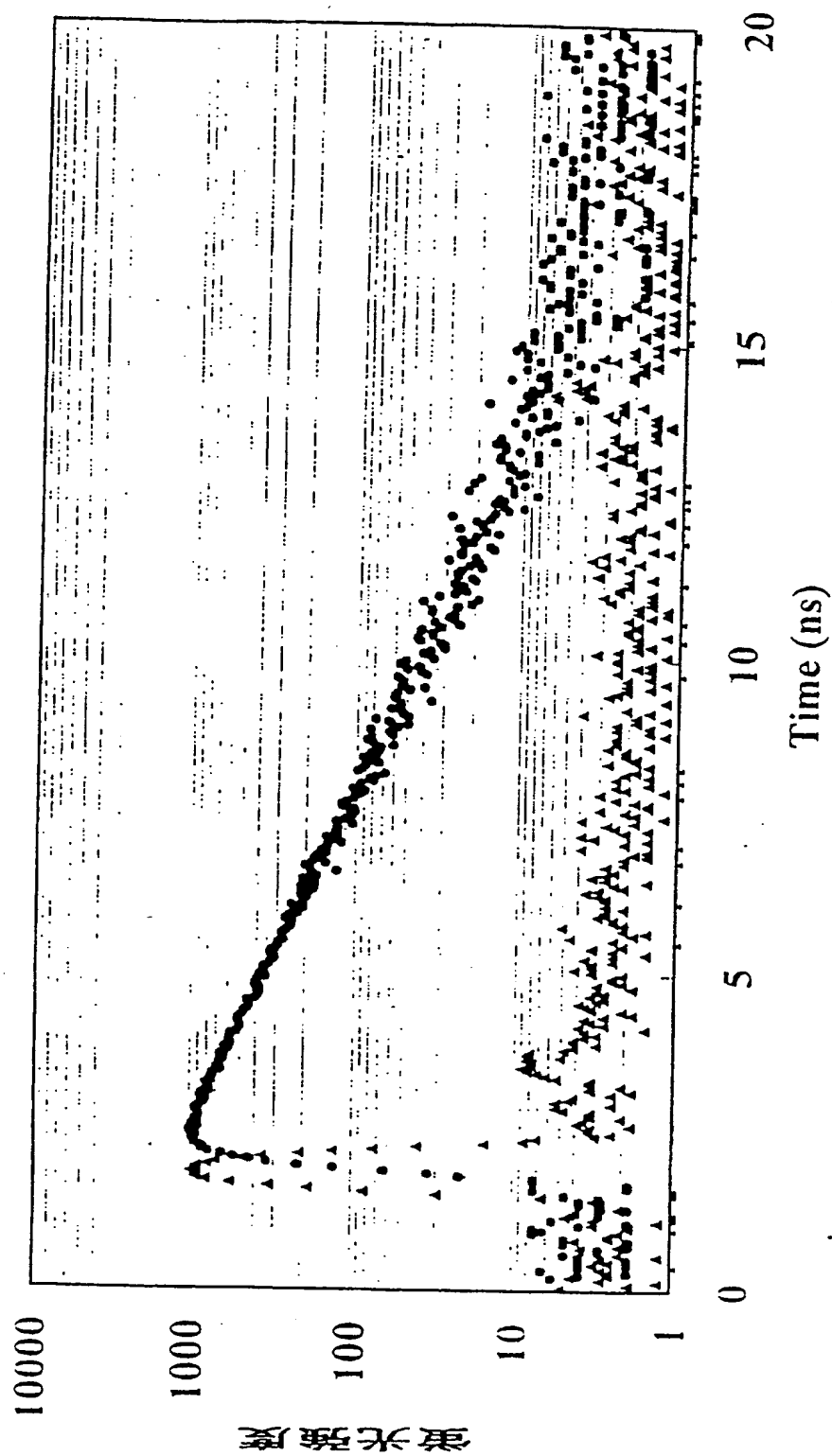
Bodipy/Cy5, 2本鎖 strand, $n=4$ 

図10

Bodipy/Cy5, 2本鎖 strand, n=8

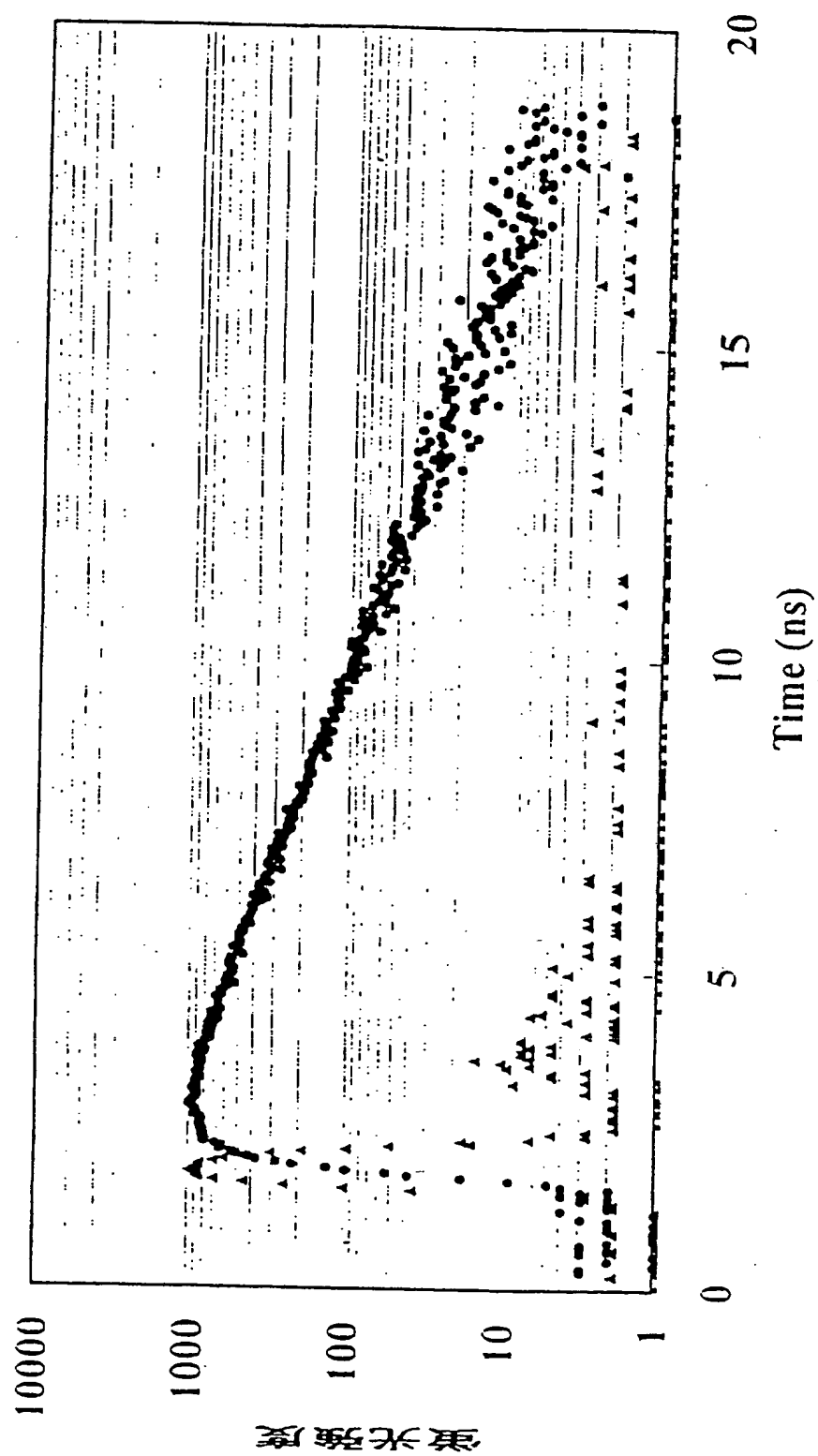


図17

Bodipy/Cy5, 2本鎖 strand, n=10

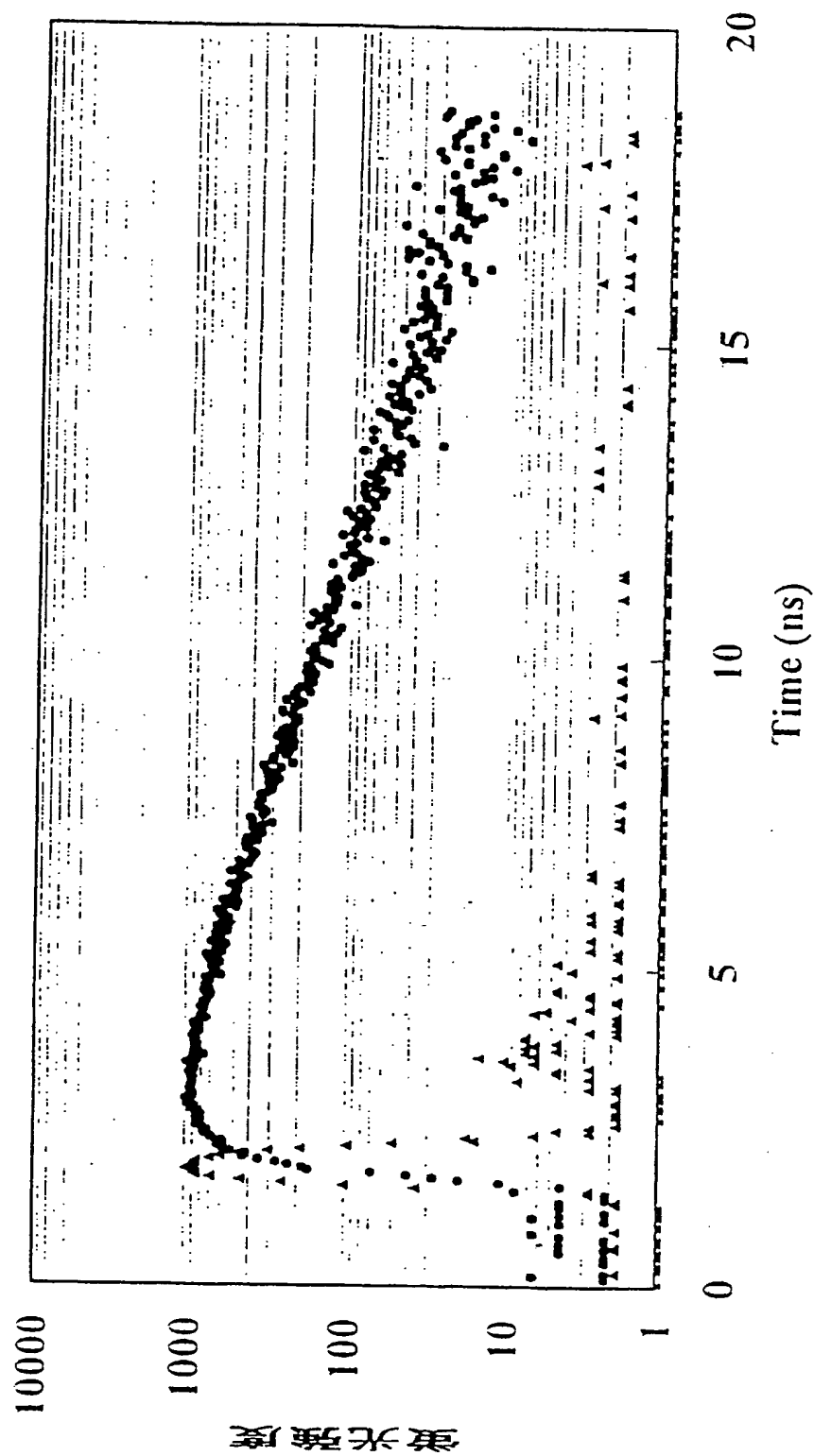


図12

Bodipy/Cy5, 2本鎖 strand, n=12

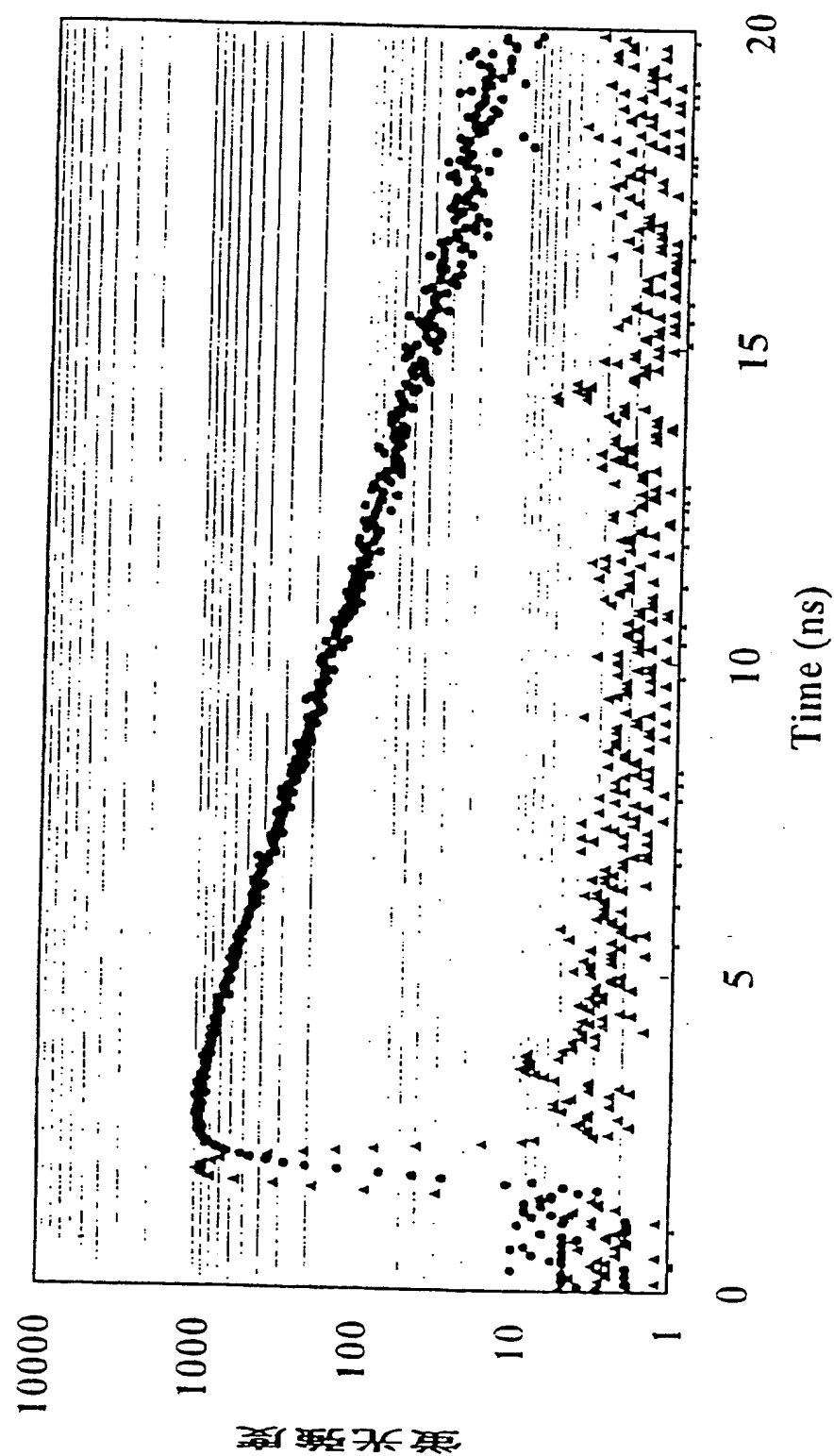


図13

Bodipy/Cy5, 2本鎖 strand, n=14

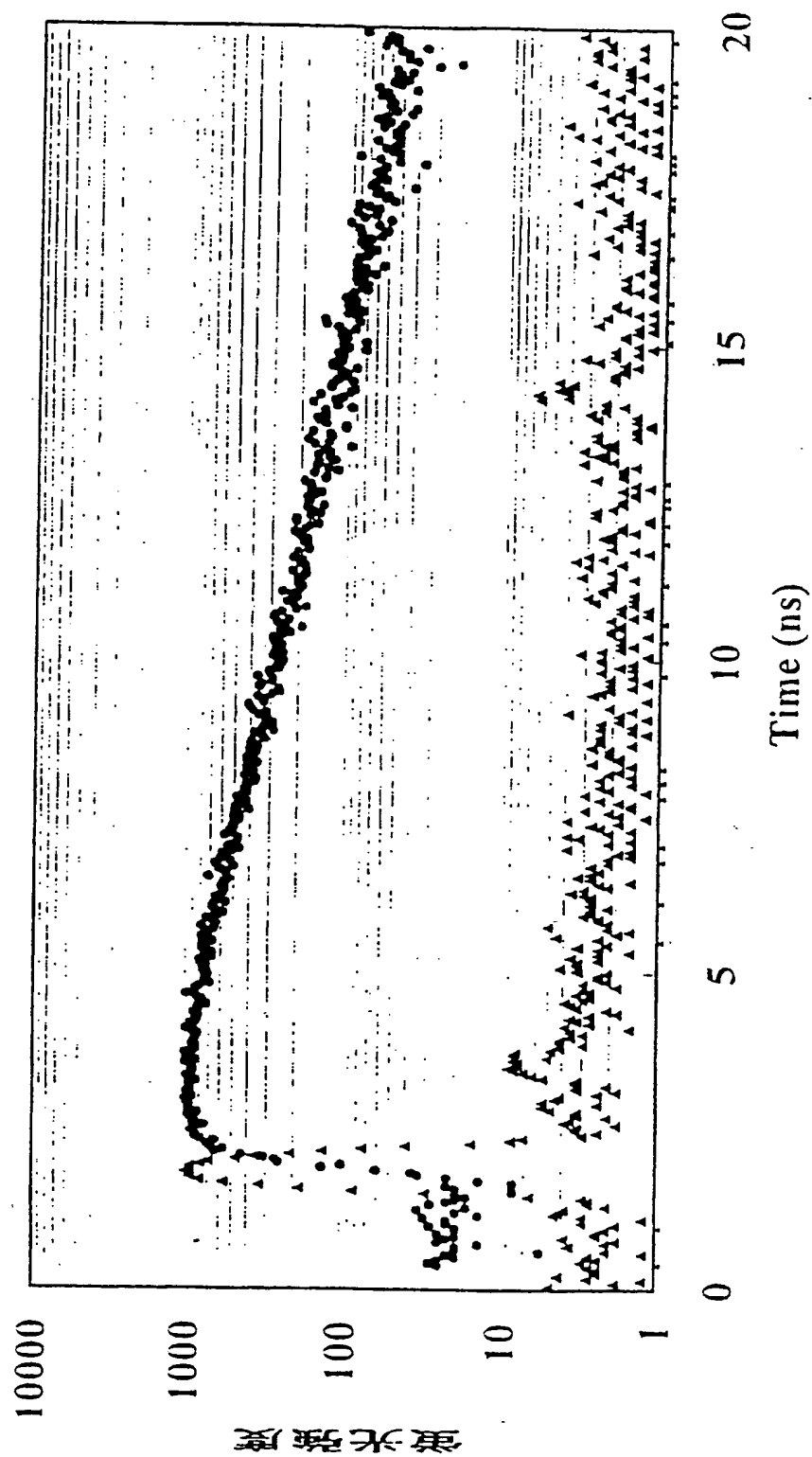


図14

Bodipy + Cy5 (コントロール)

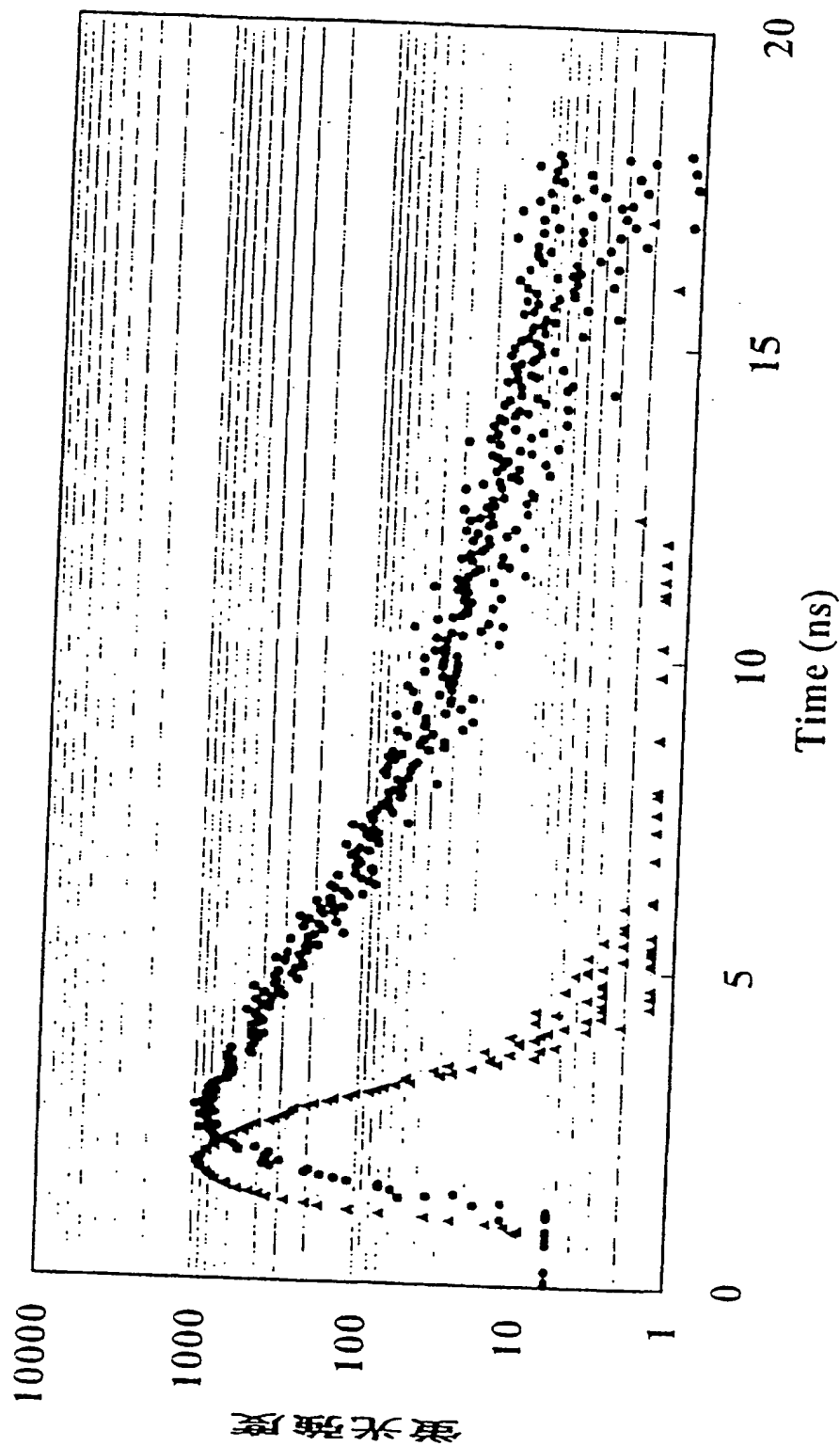


図15

Bodipy/Cy5, 1本鎖 + 2本鎖 (n=10), 4770

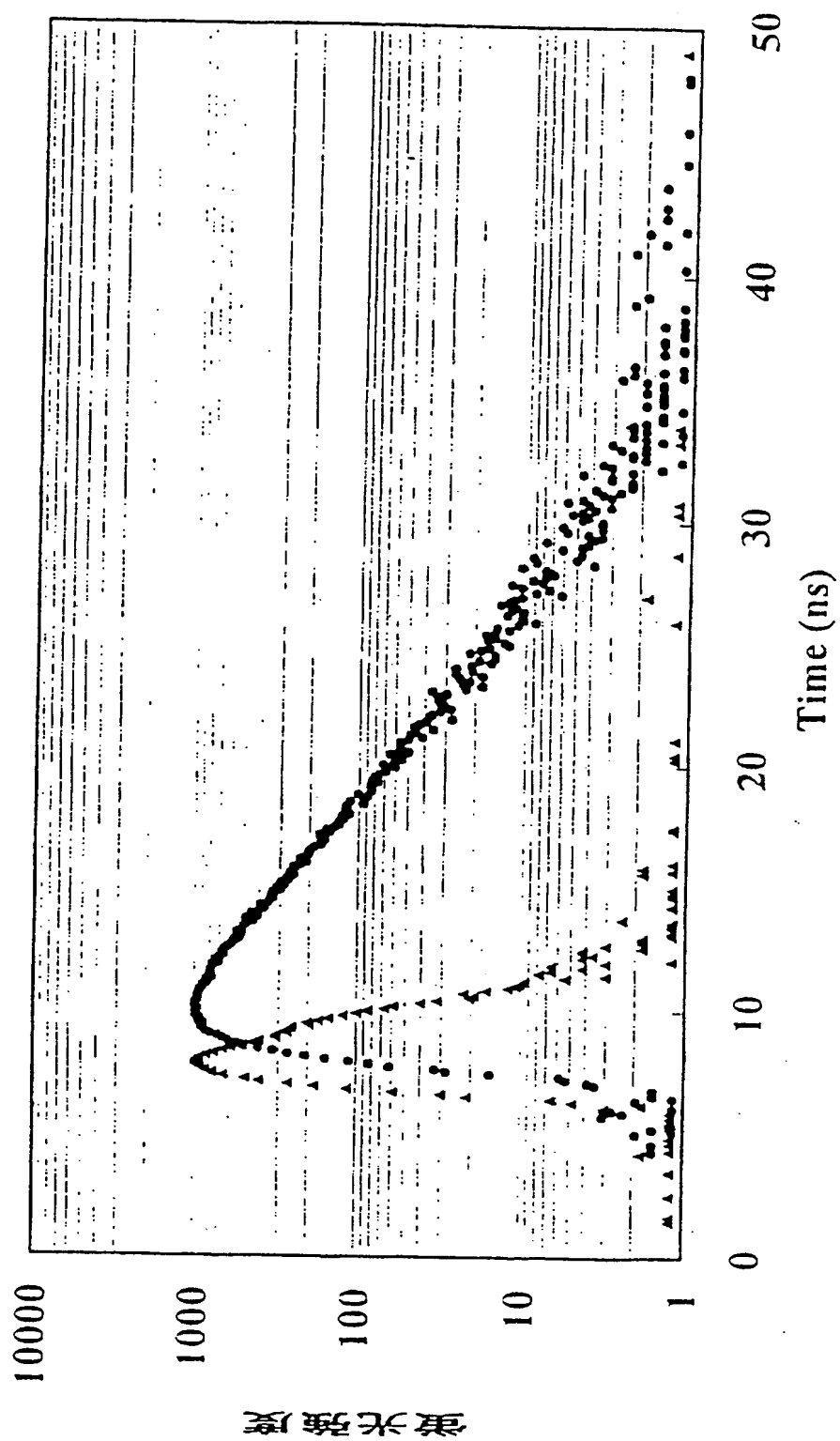


図16

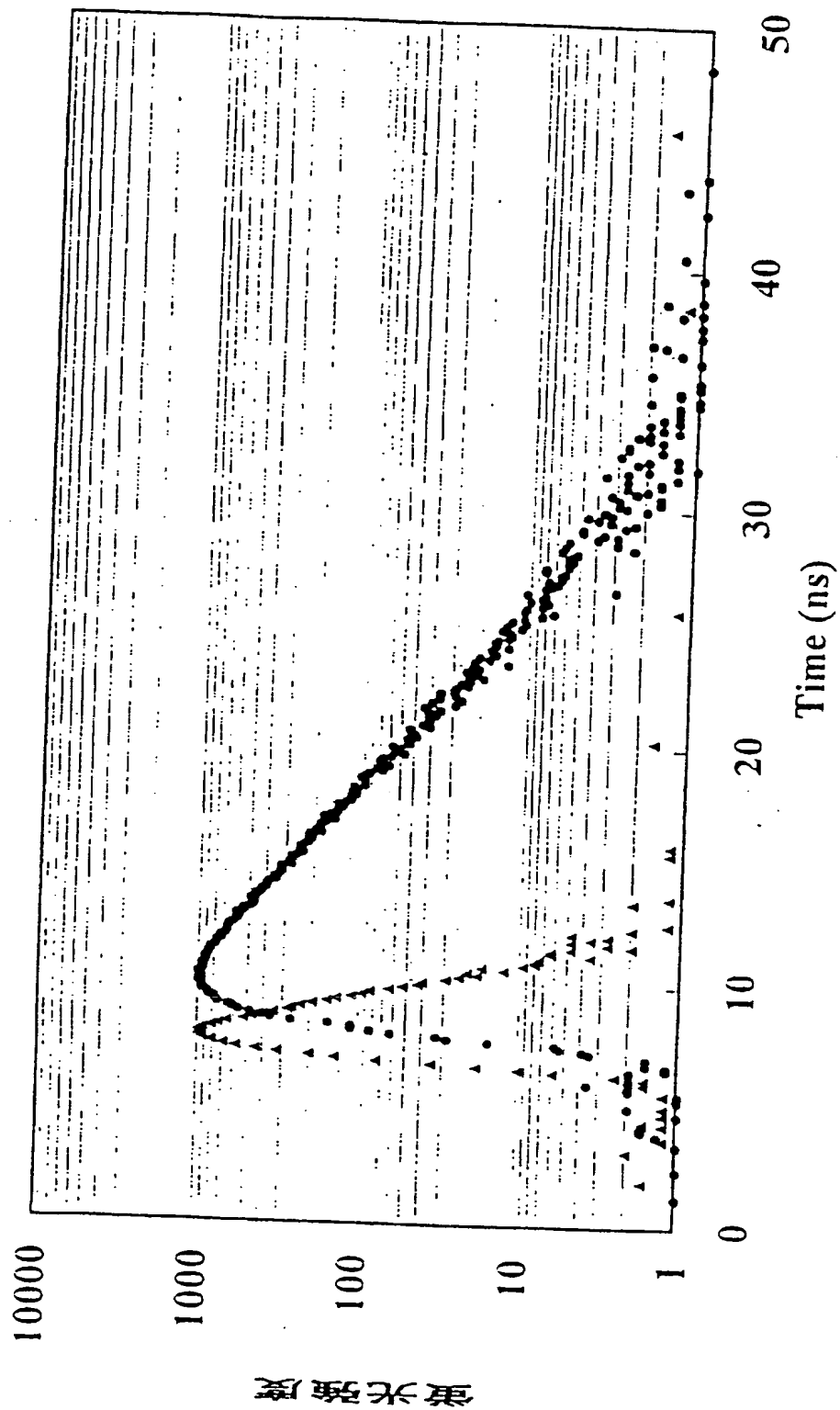
Bodipy/Cy5, 1本鎖 + 2本鎖 (n=10), γ 72

図17

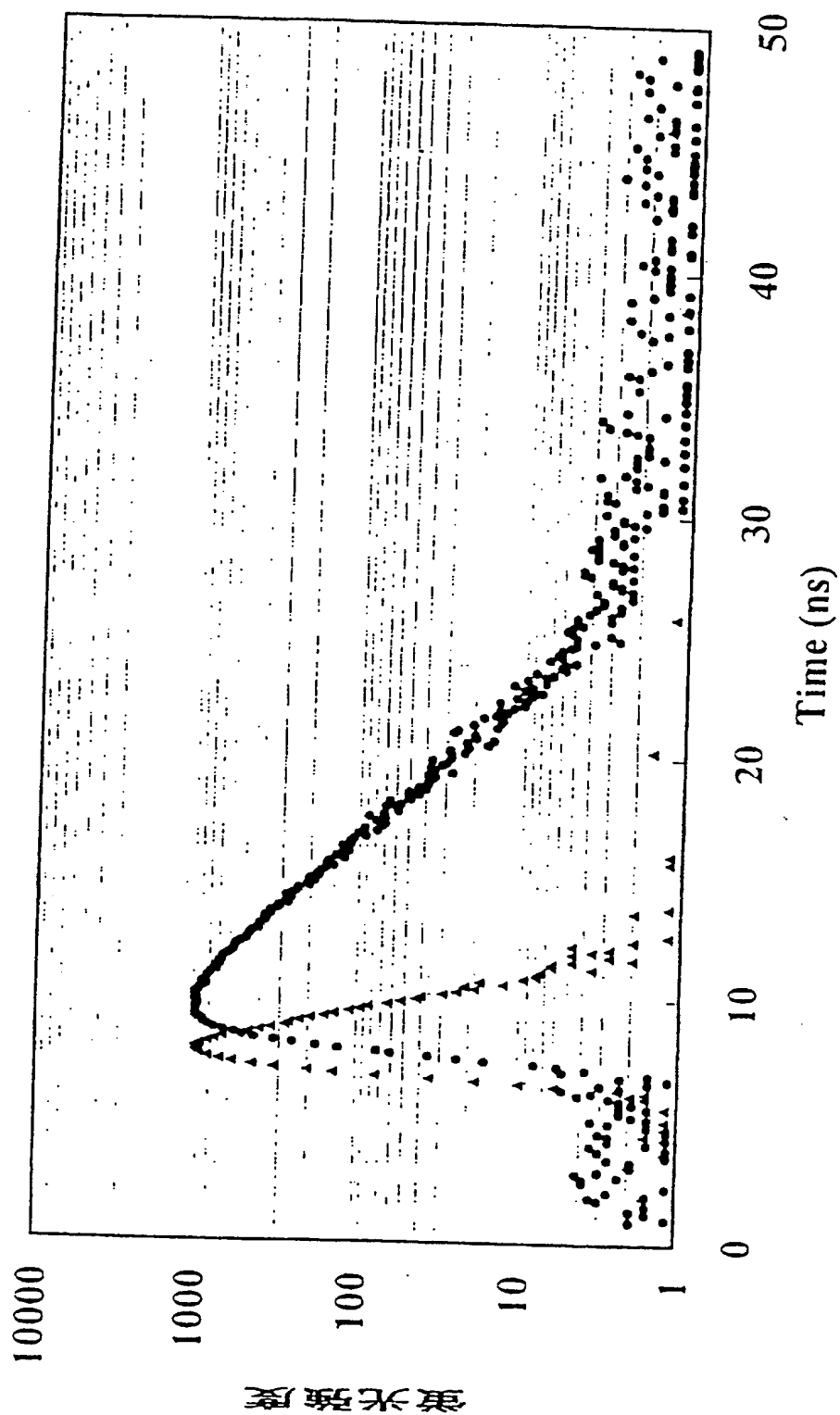
Bodipy/Cy5, 1本鎖 + 2本鎖 ($n=10$), ユニオン

図18

Bodipy/Cy5, 1本鎖 + 2本鎖 (n=10), ヤッ7.6

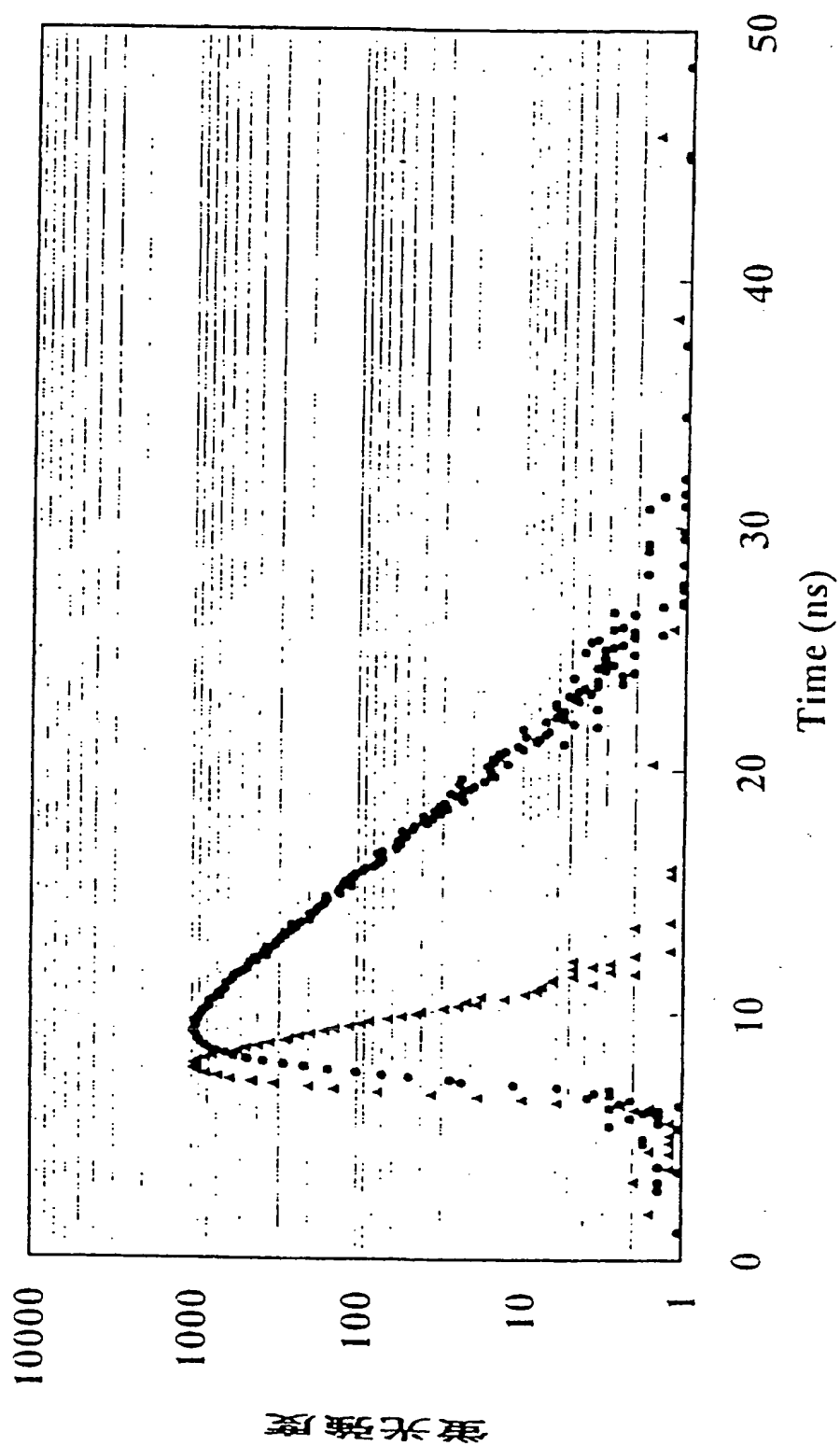


図19

Bodipy + Cy5 (コントロール)

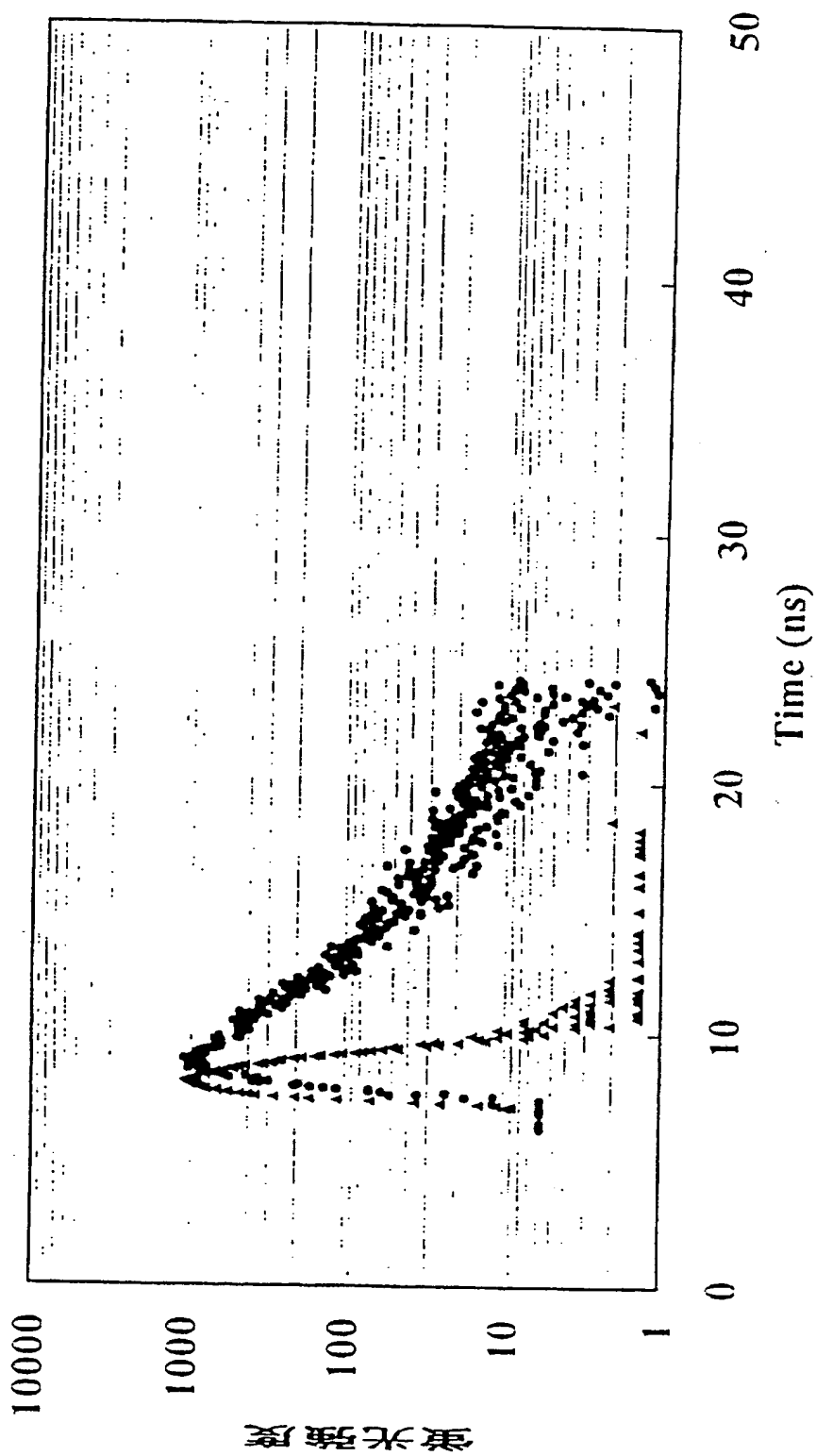


図20

Bodipy/Cy5, 2本鎖 (n=10), 0

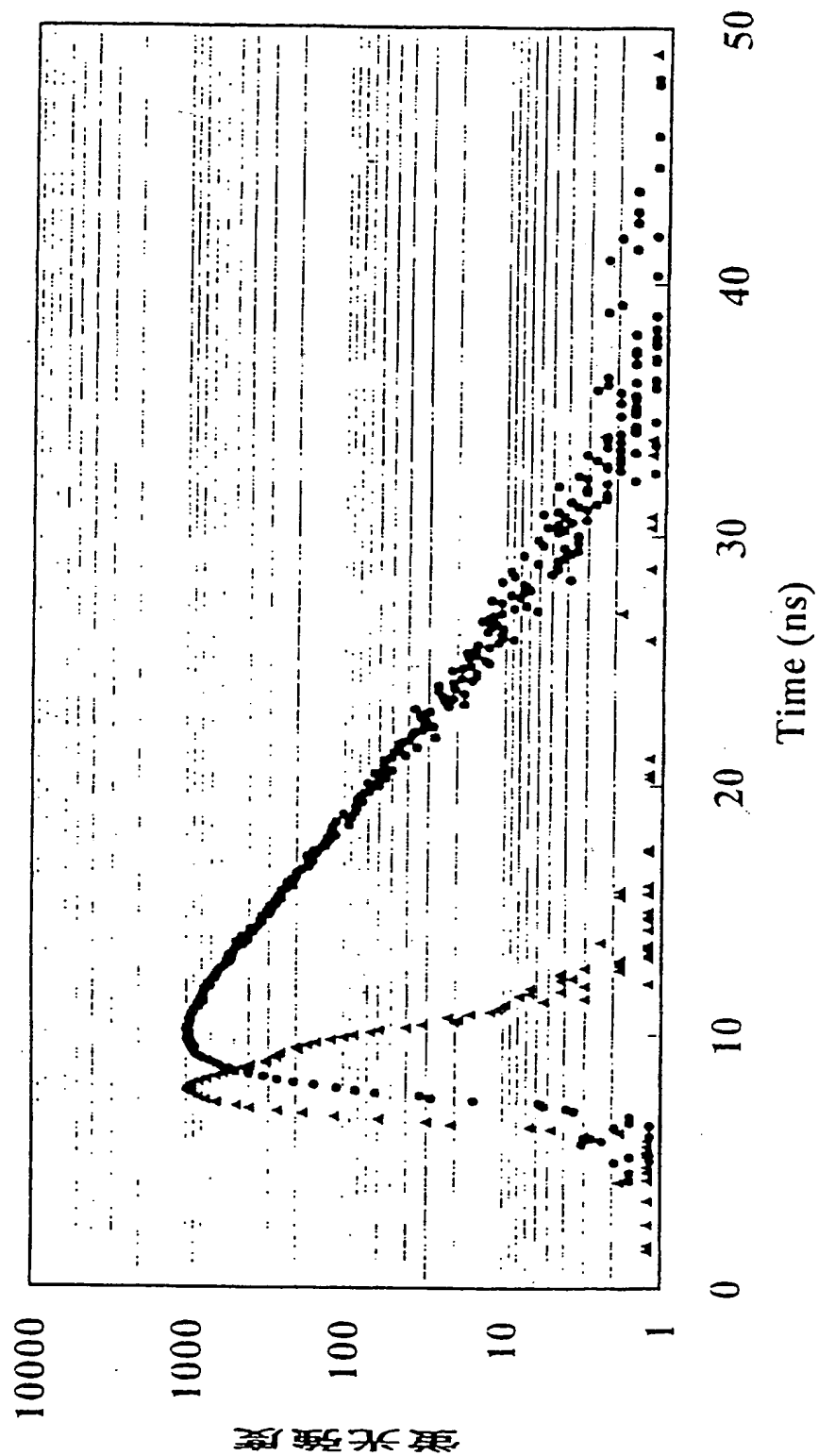


図21

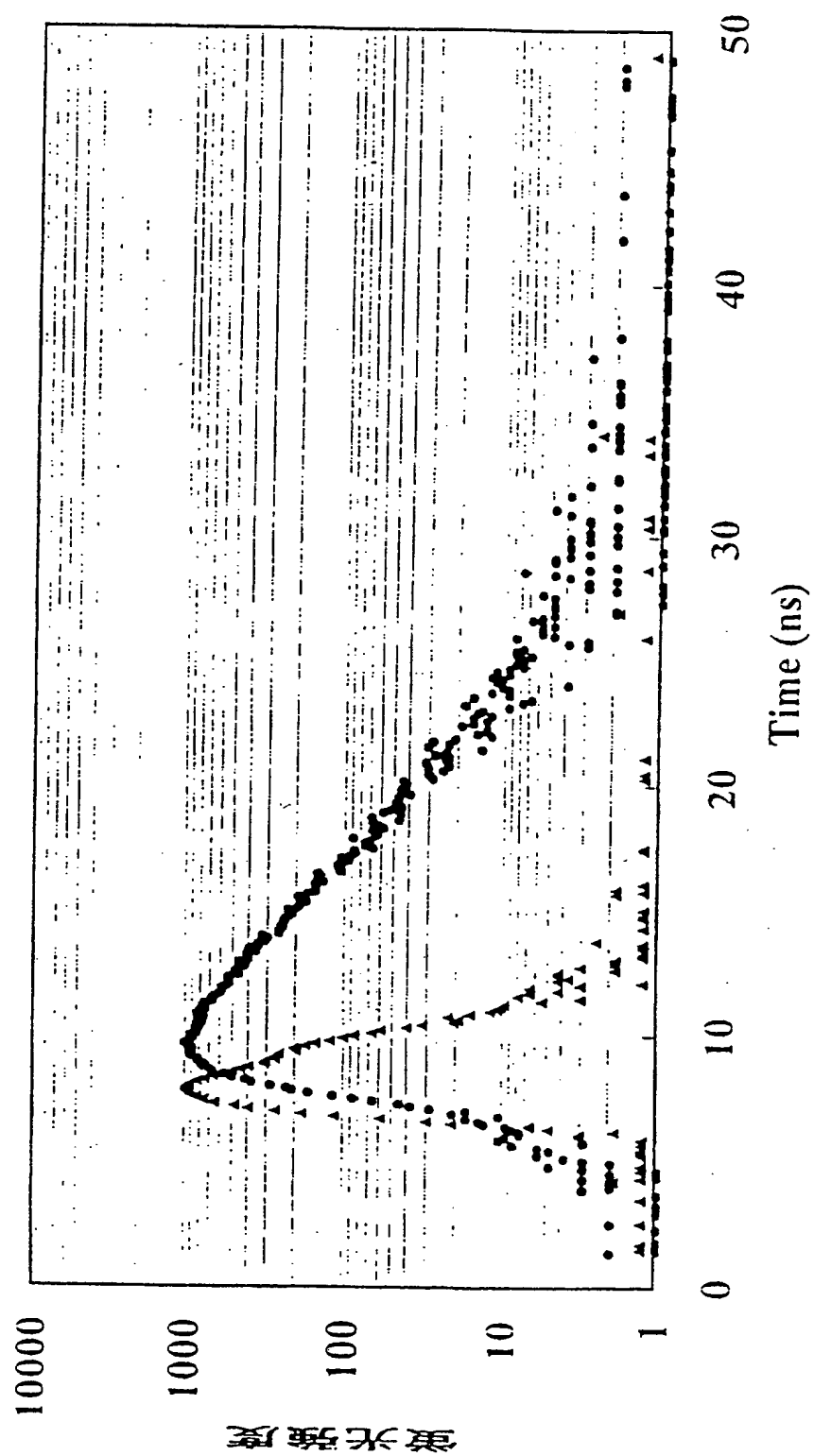
Bodipy/Cy5, 2本鎖 ($n=10$), I

図22

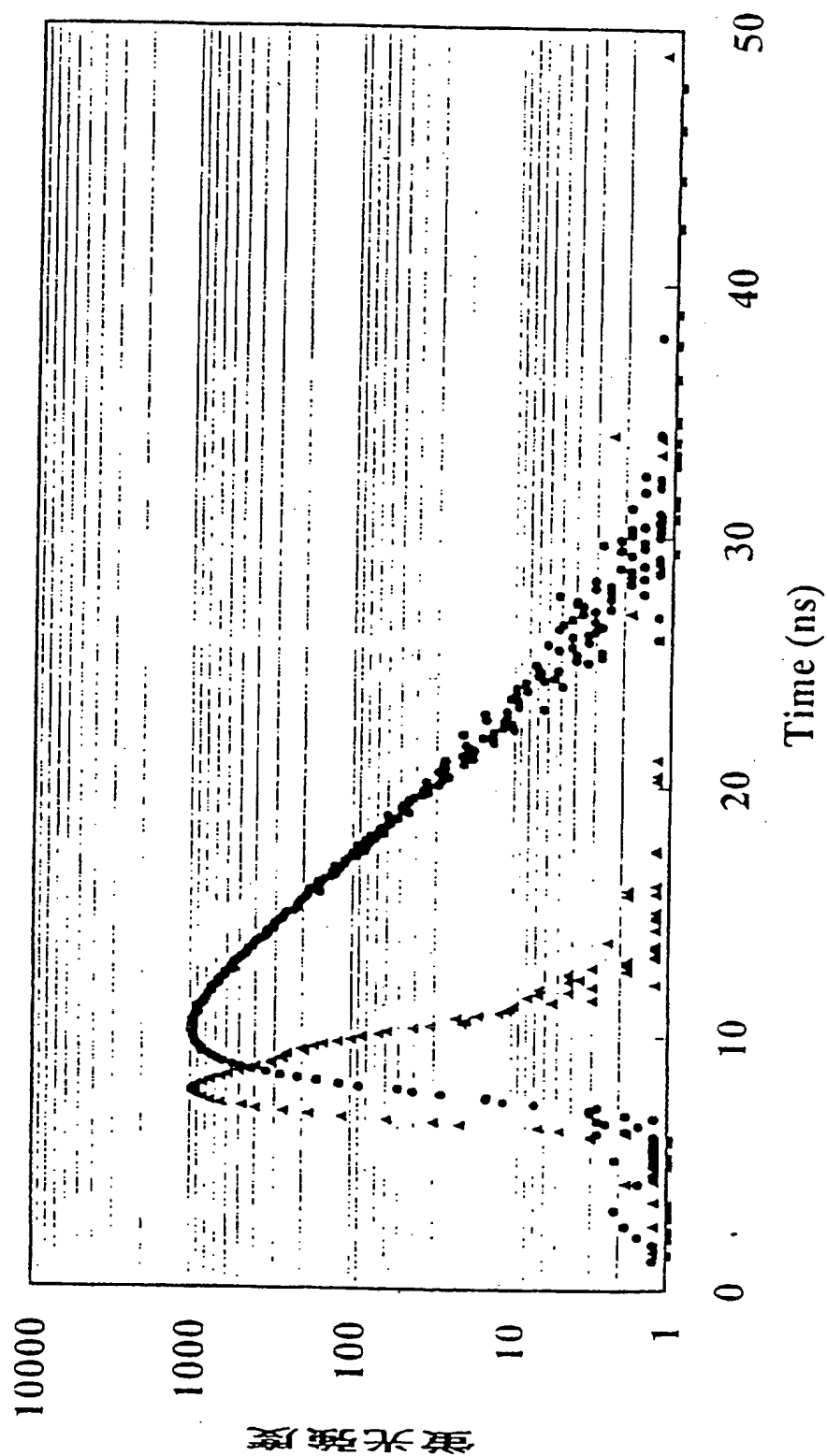
Bodipy/Cy5, 2本鎖 ($n=10$), 2

図23

Bodipy/Cy5, 2本鎖 ($n=10$), 4

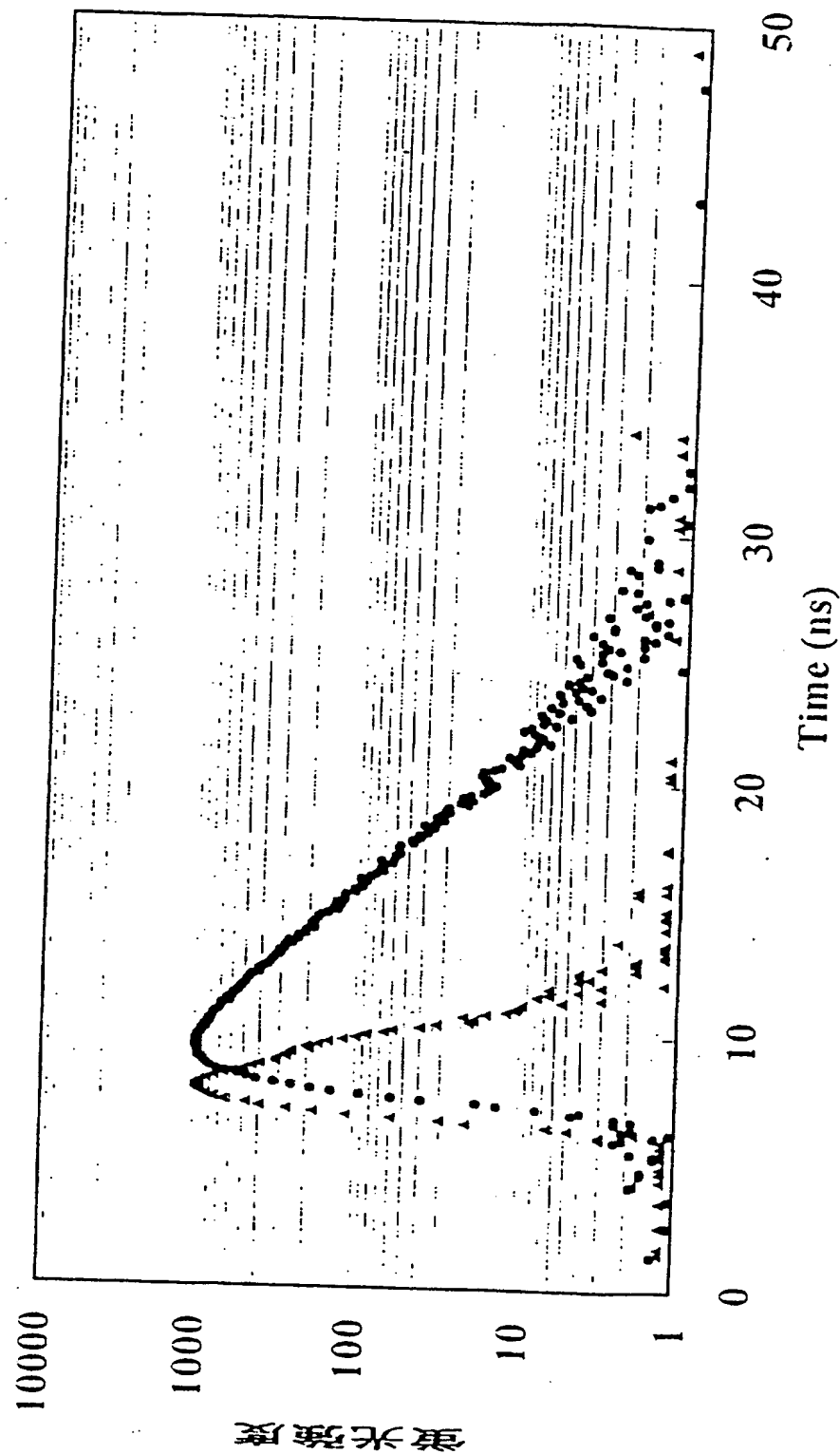


図24

Bodipy + Cy5 (コントロール)

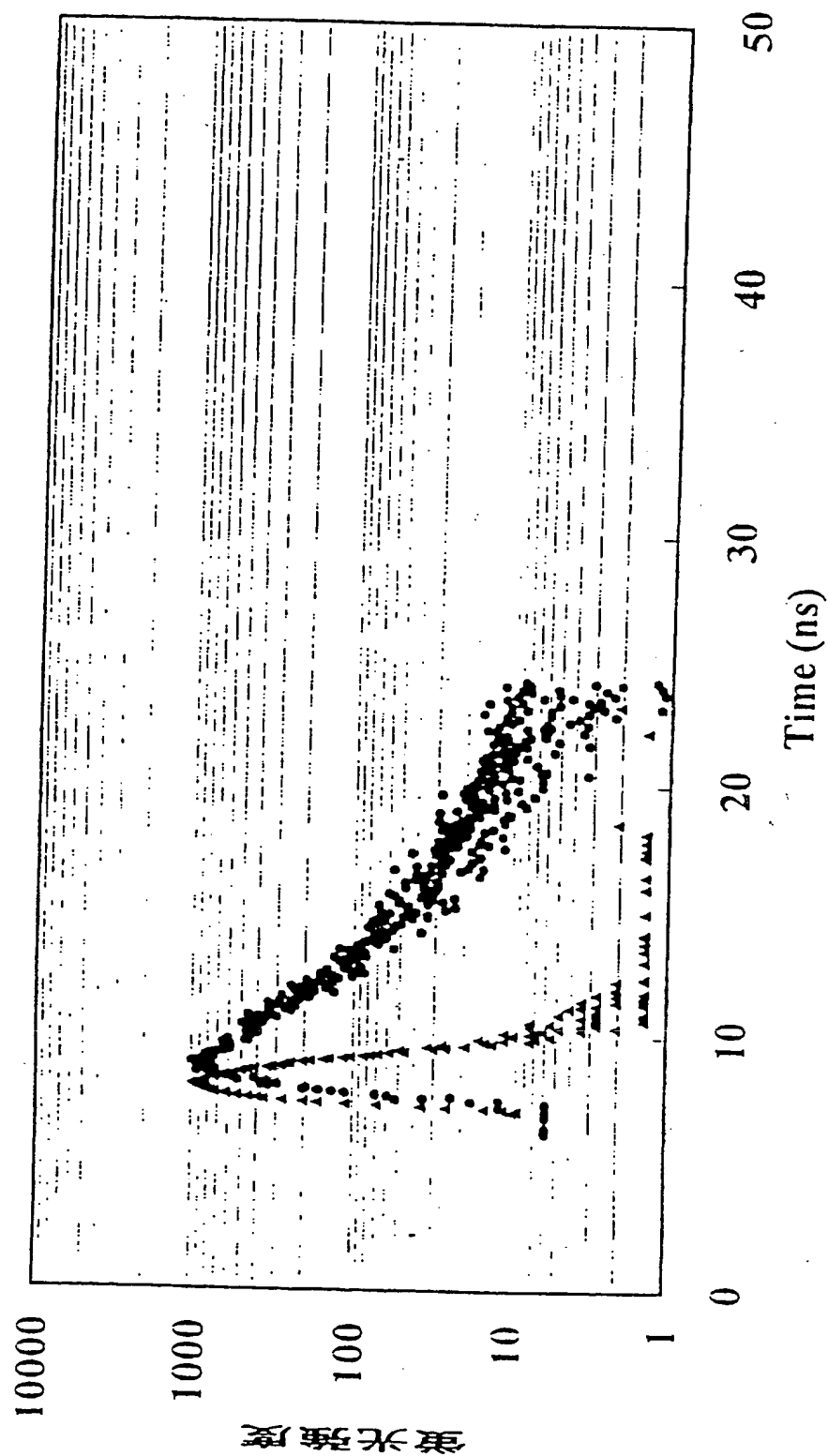


図25

Bodipy/Cy3.5, 2本鎖 strand, n=8

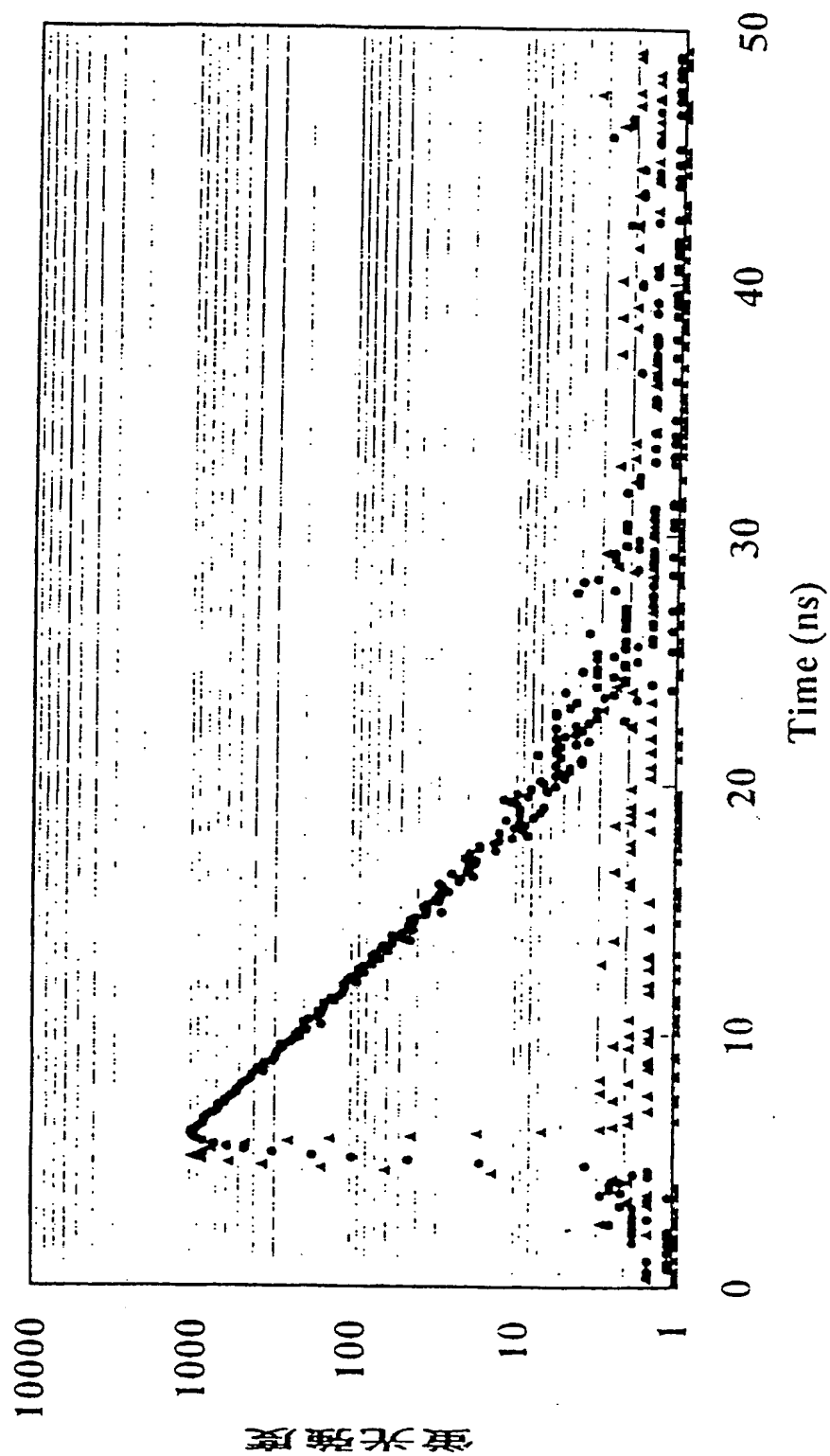


図26

Bodipy/Cy3.5, 2本鎖 strand, n=12

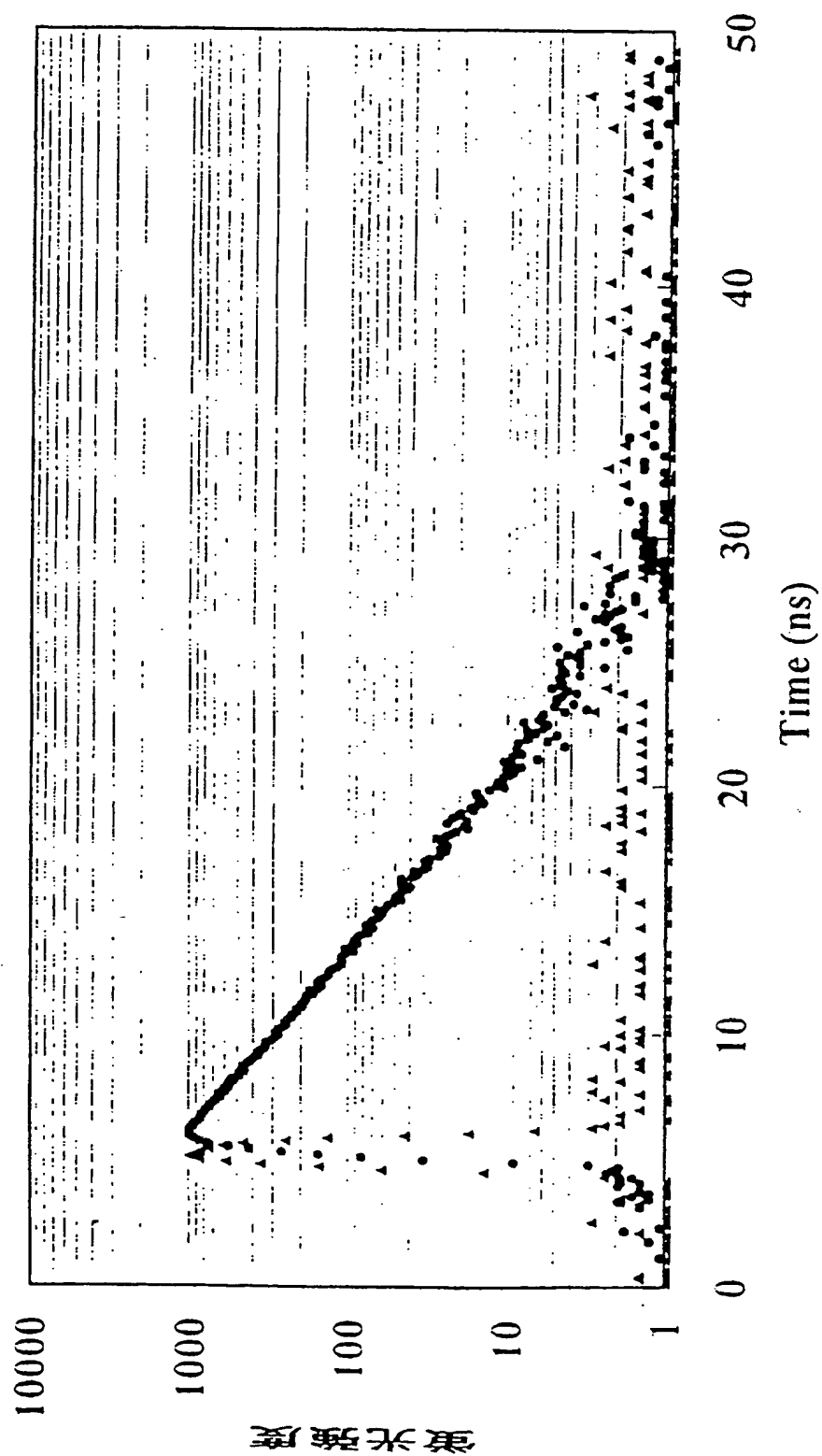


図27

Bodipy/Cy3.5, 2本鎖 strand, n=16

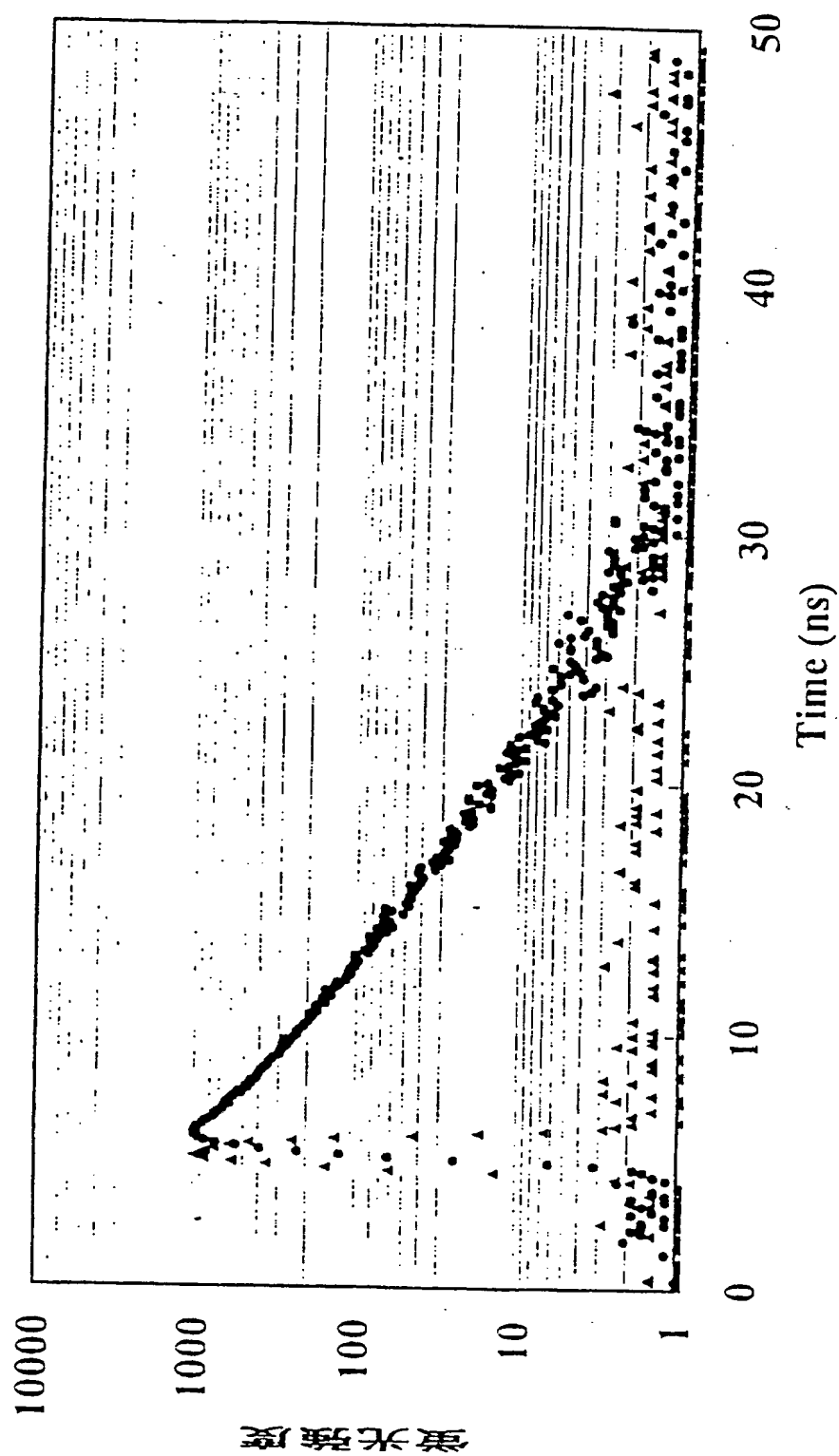


図28

Bodipy + Cy3.5 (コントロール)

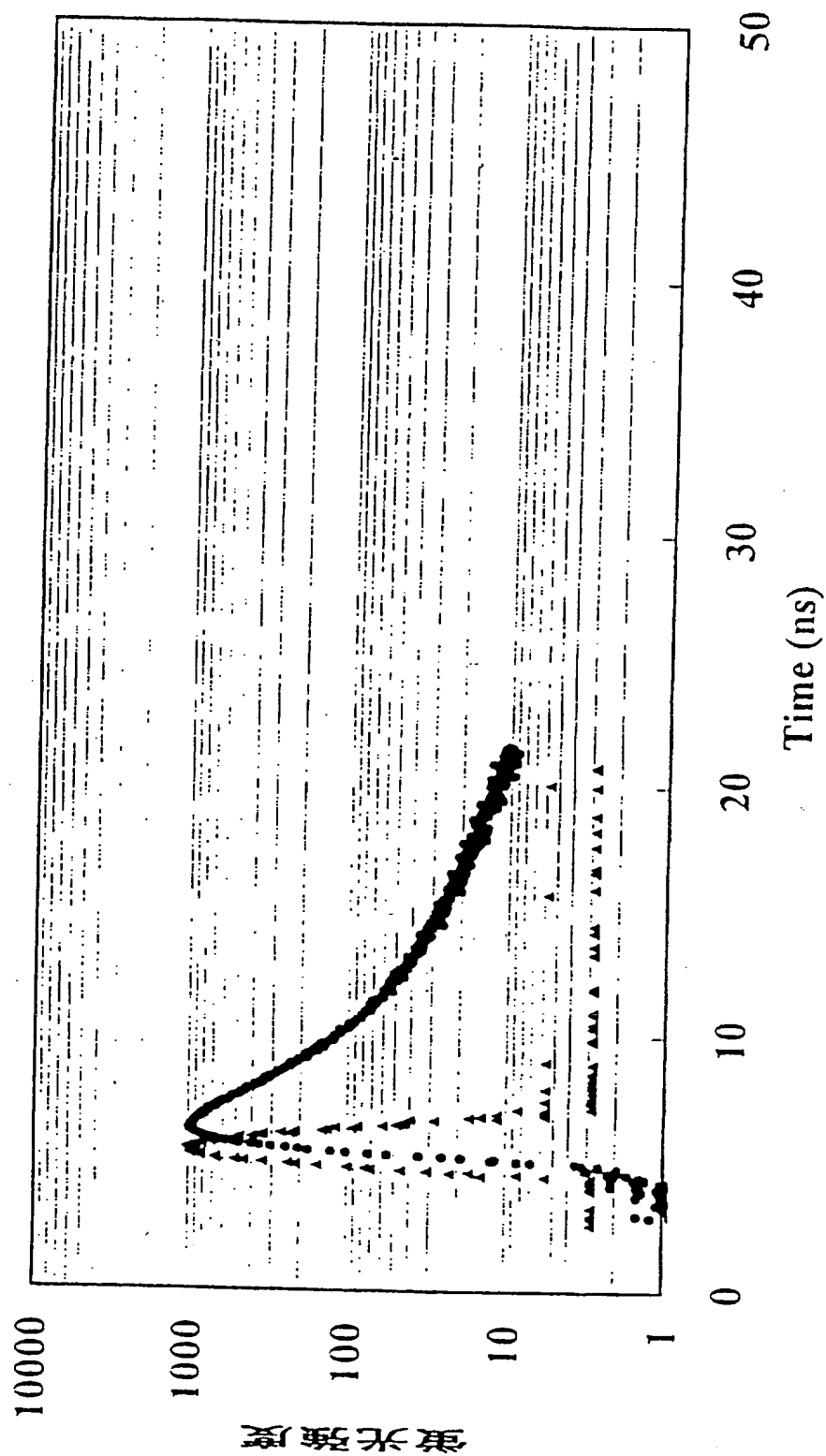


図29

Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, n=4

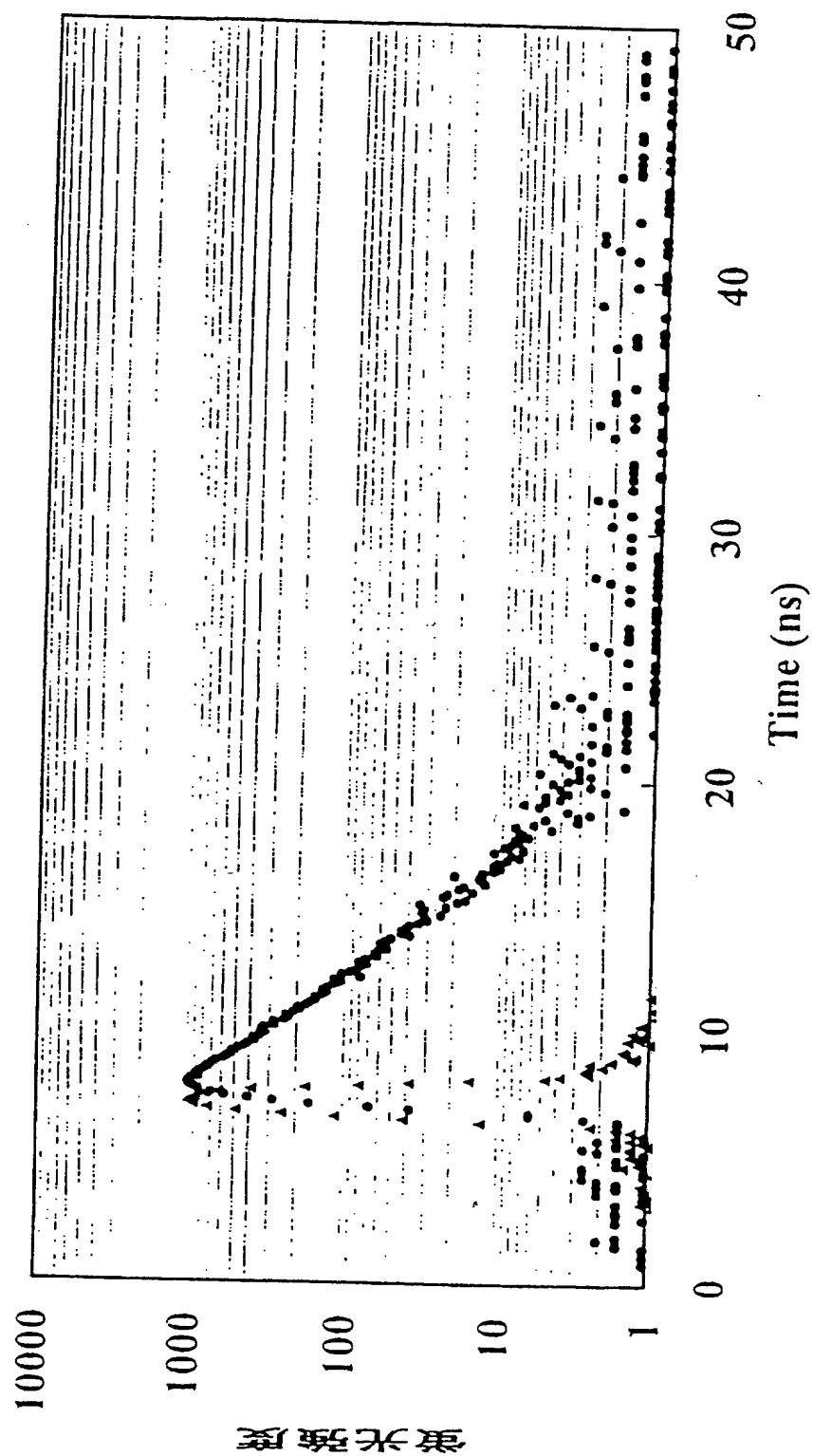


図30

Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, n=8

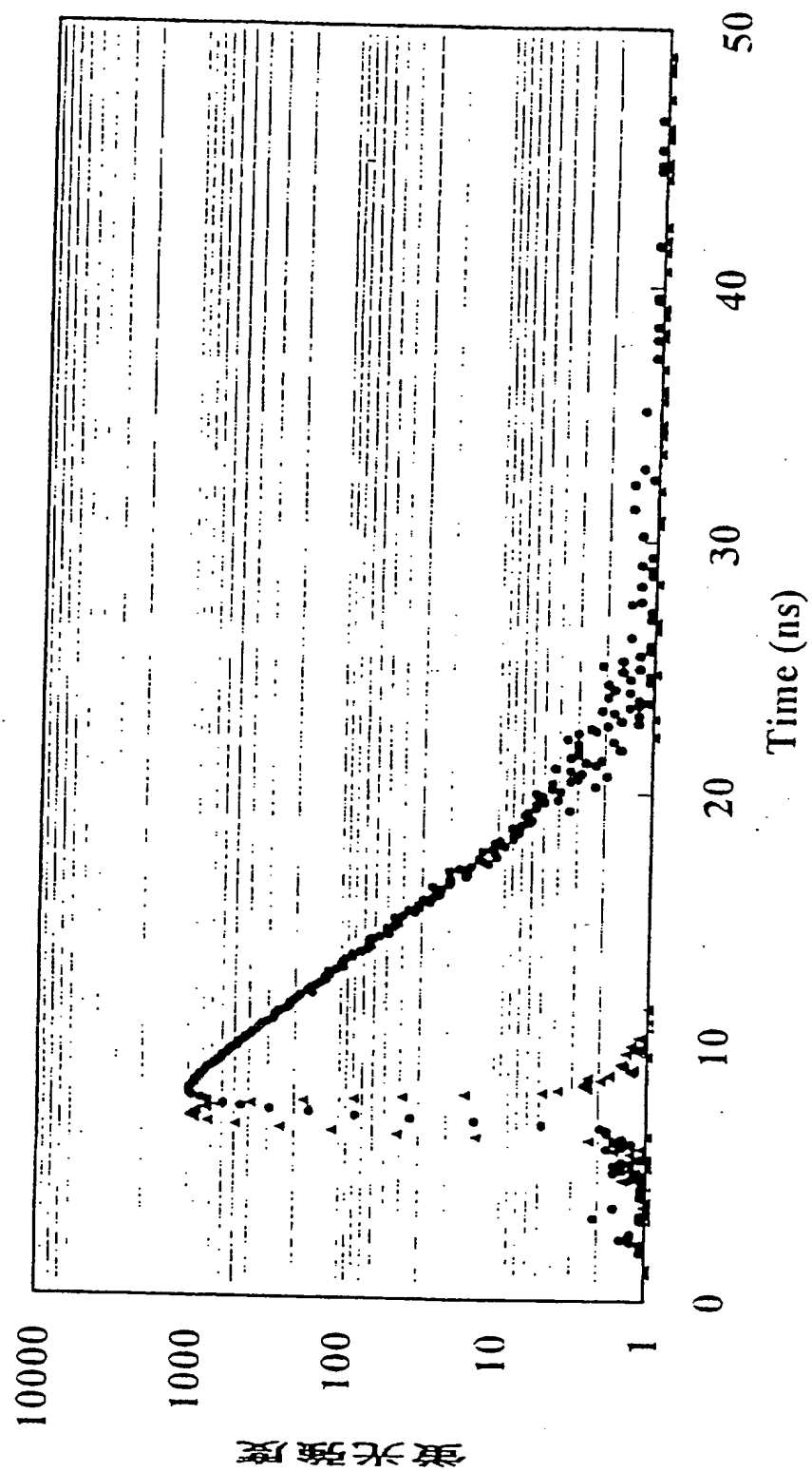


図31

Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, n=10

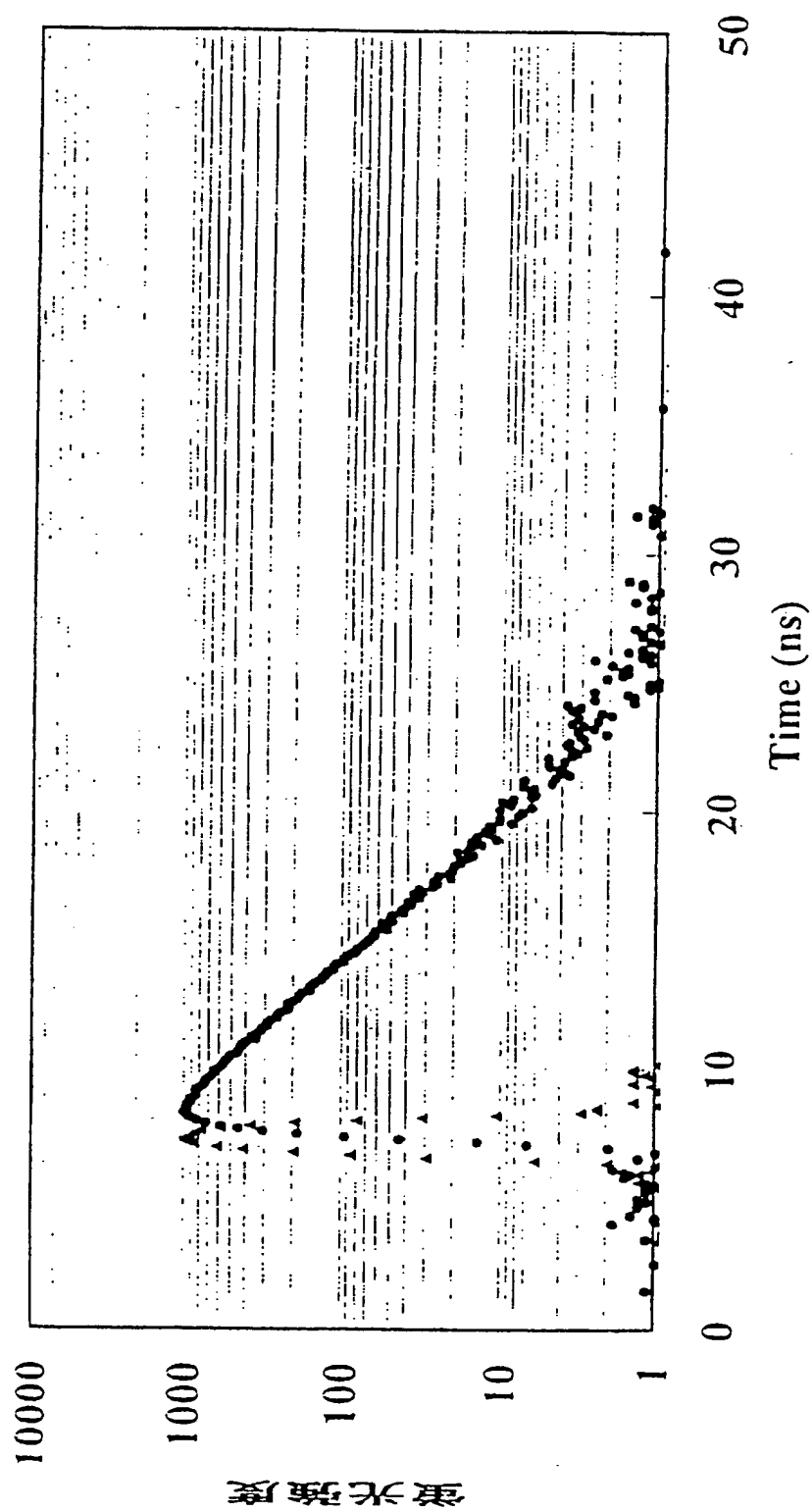


図32

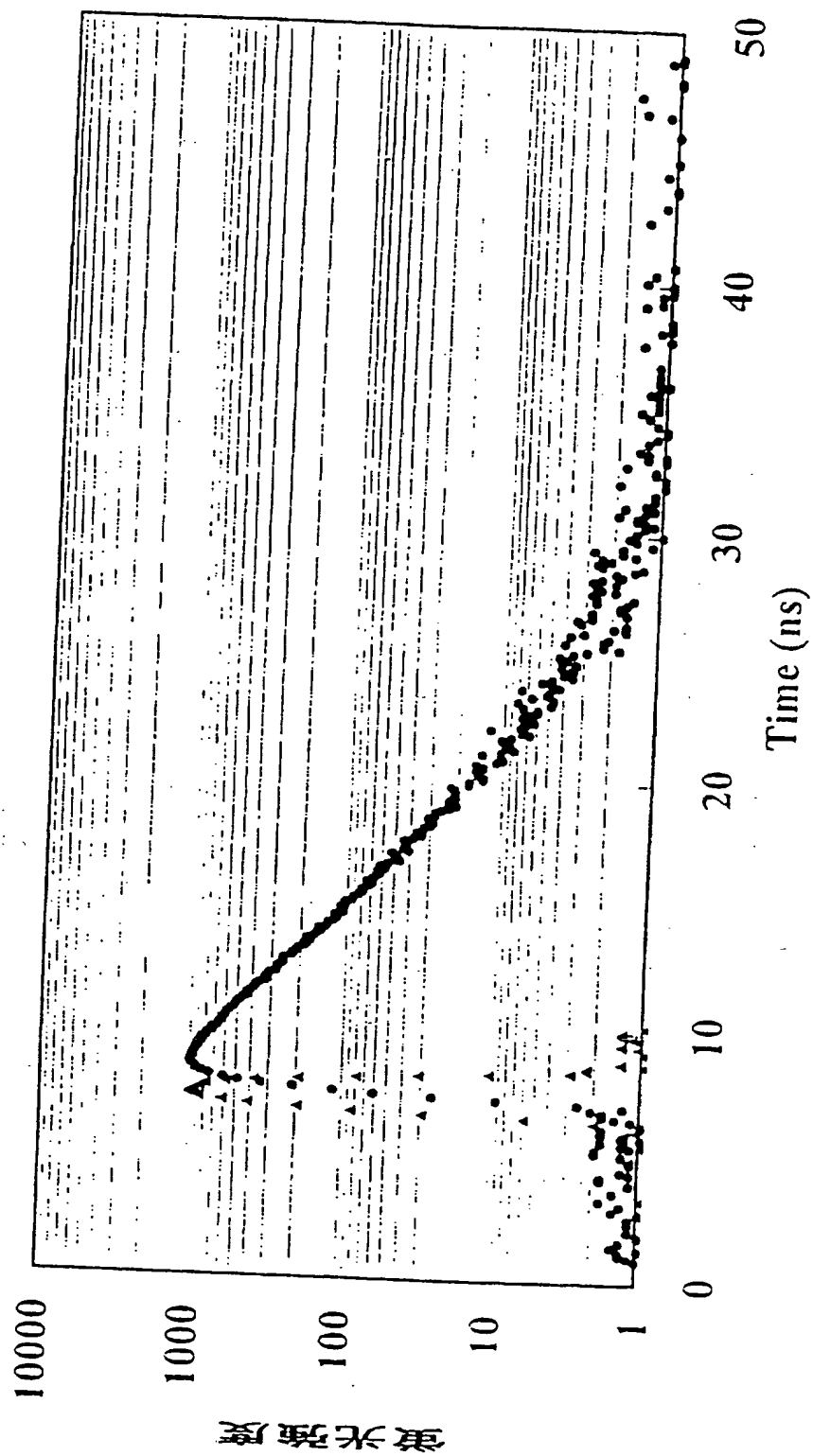
Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, $n=12$ 

図33

Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, n=15

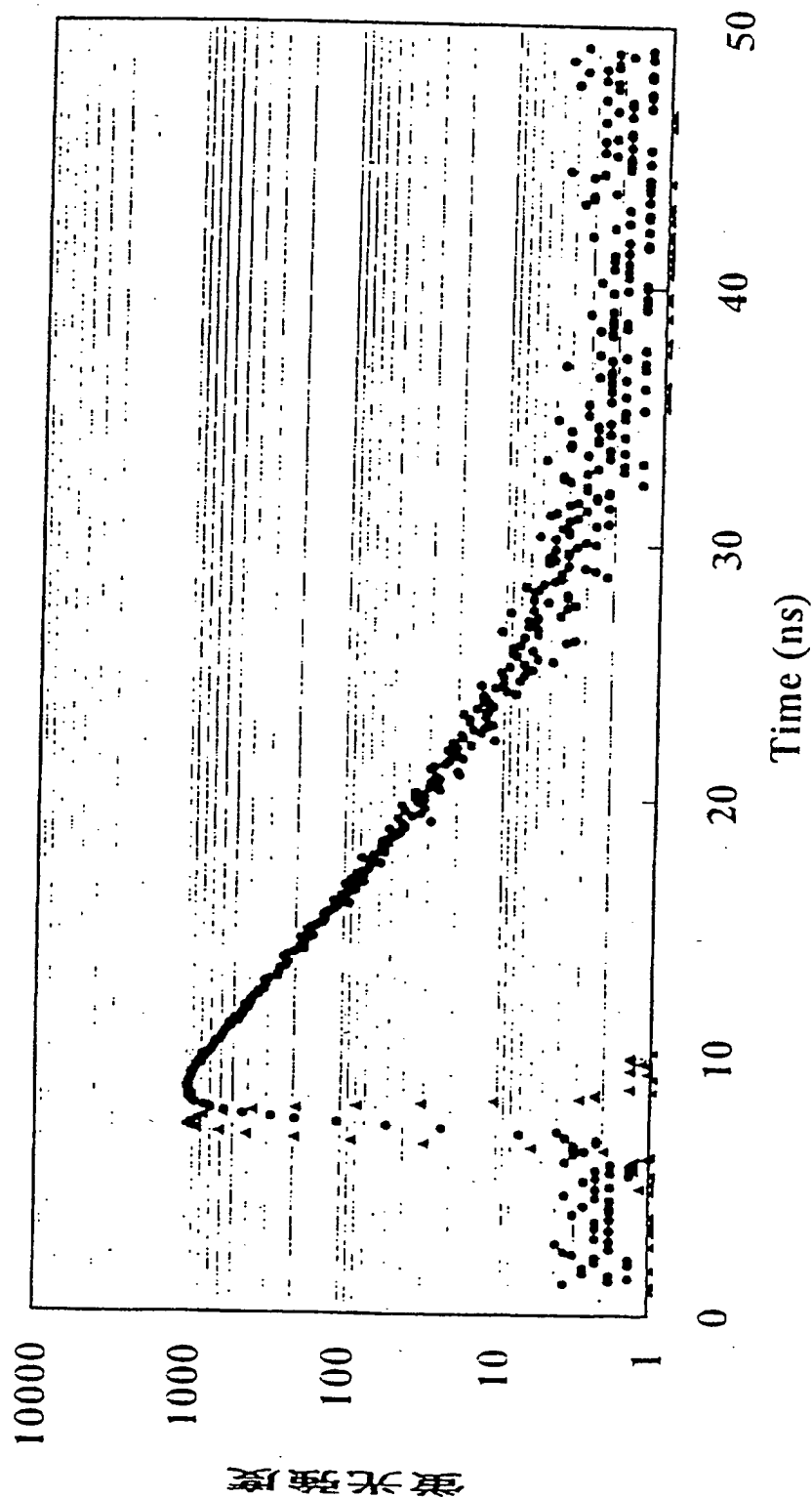


図34

Bodipy/Cy5, 1本鎖 strand, n=20

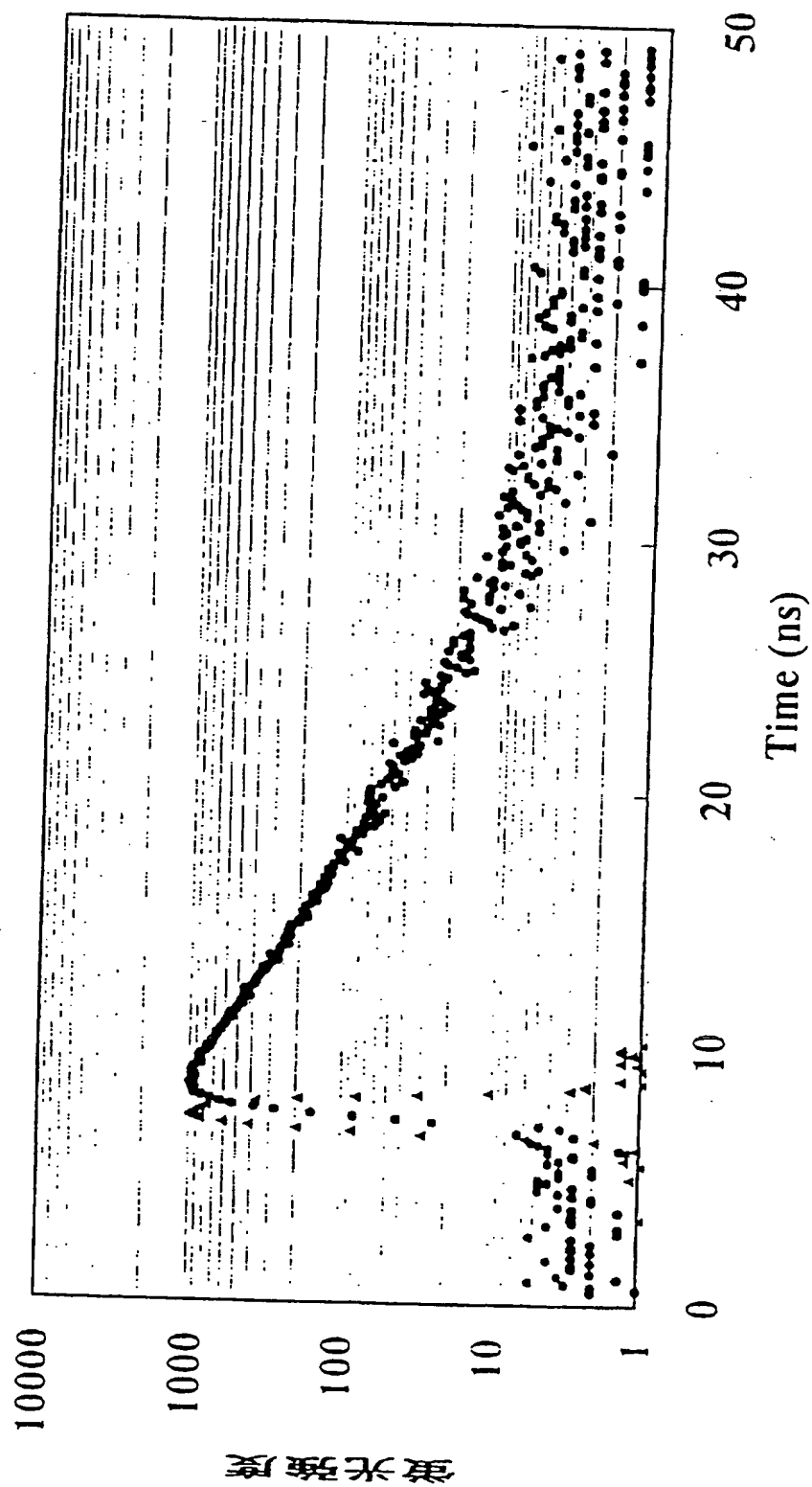


図35

Bodipy + Cy5 (コントロール)

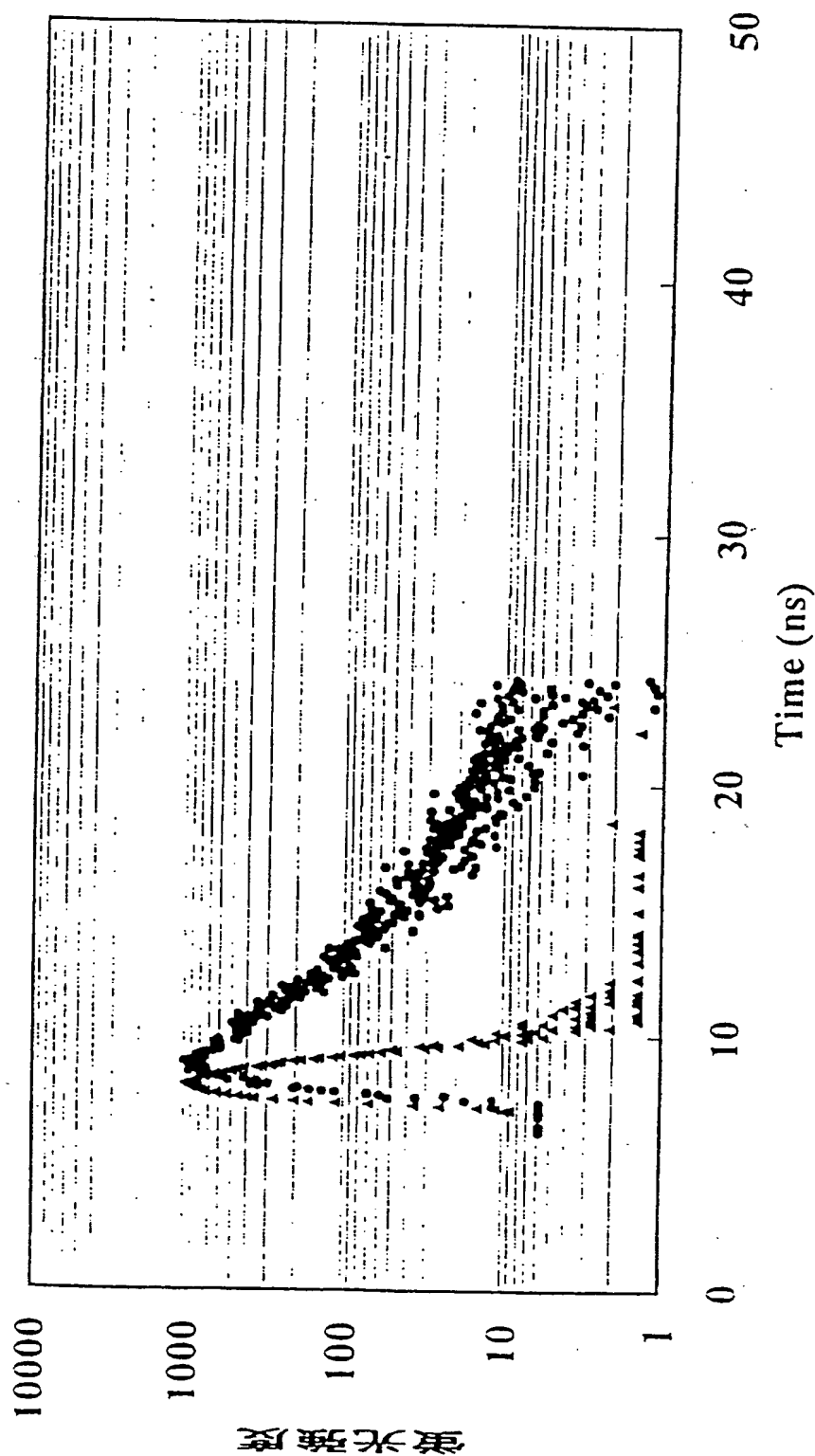
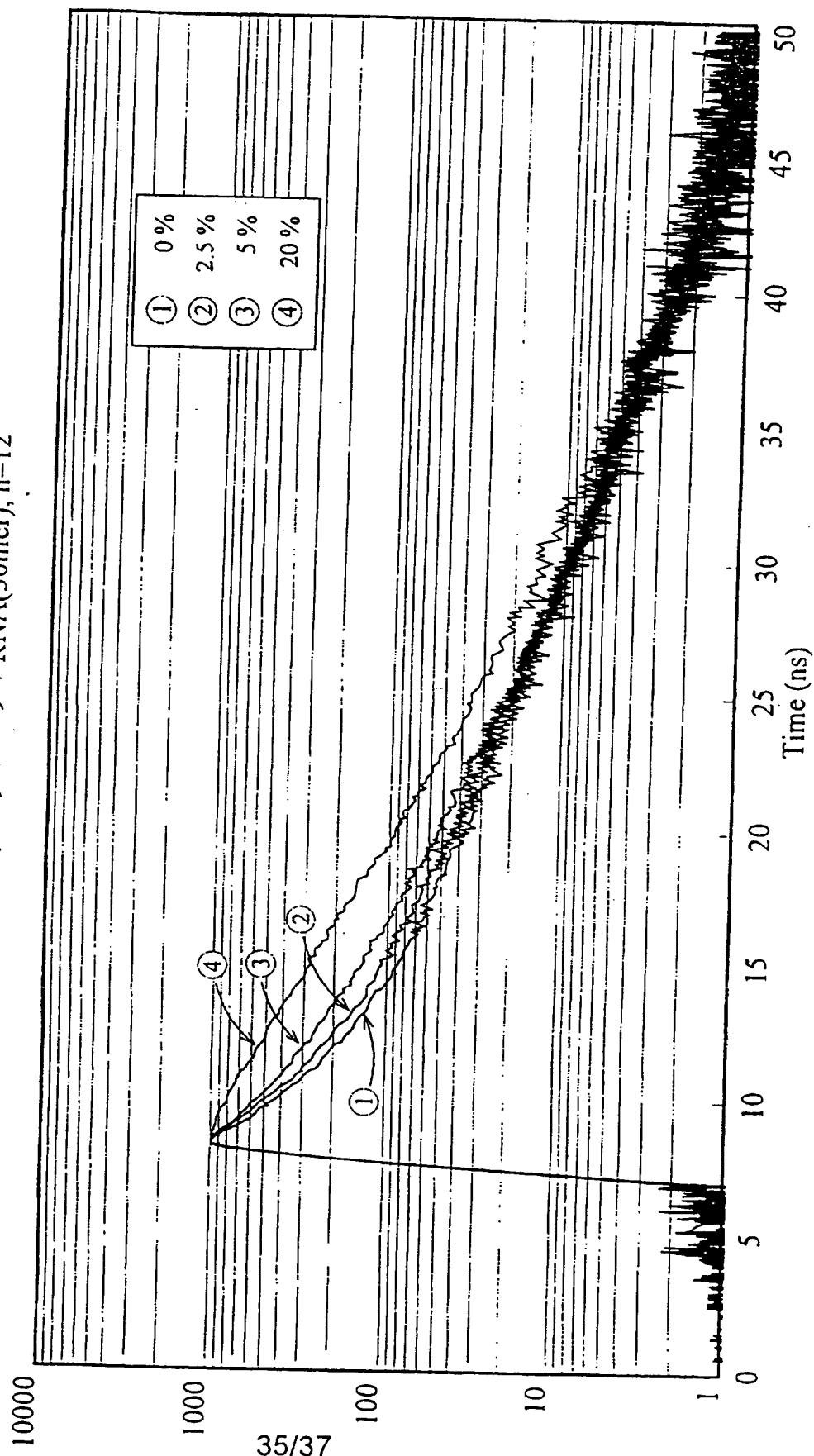


図36

D-オリゴプロブ + RNA(30mer), $n=12$ 

35/37

図37

D-オリゴブローブ+RNA(30mer), n=12

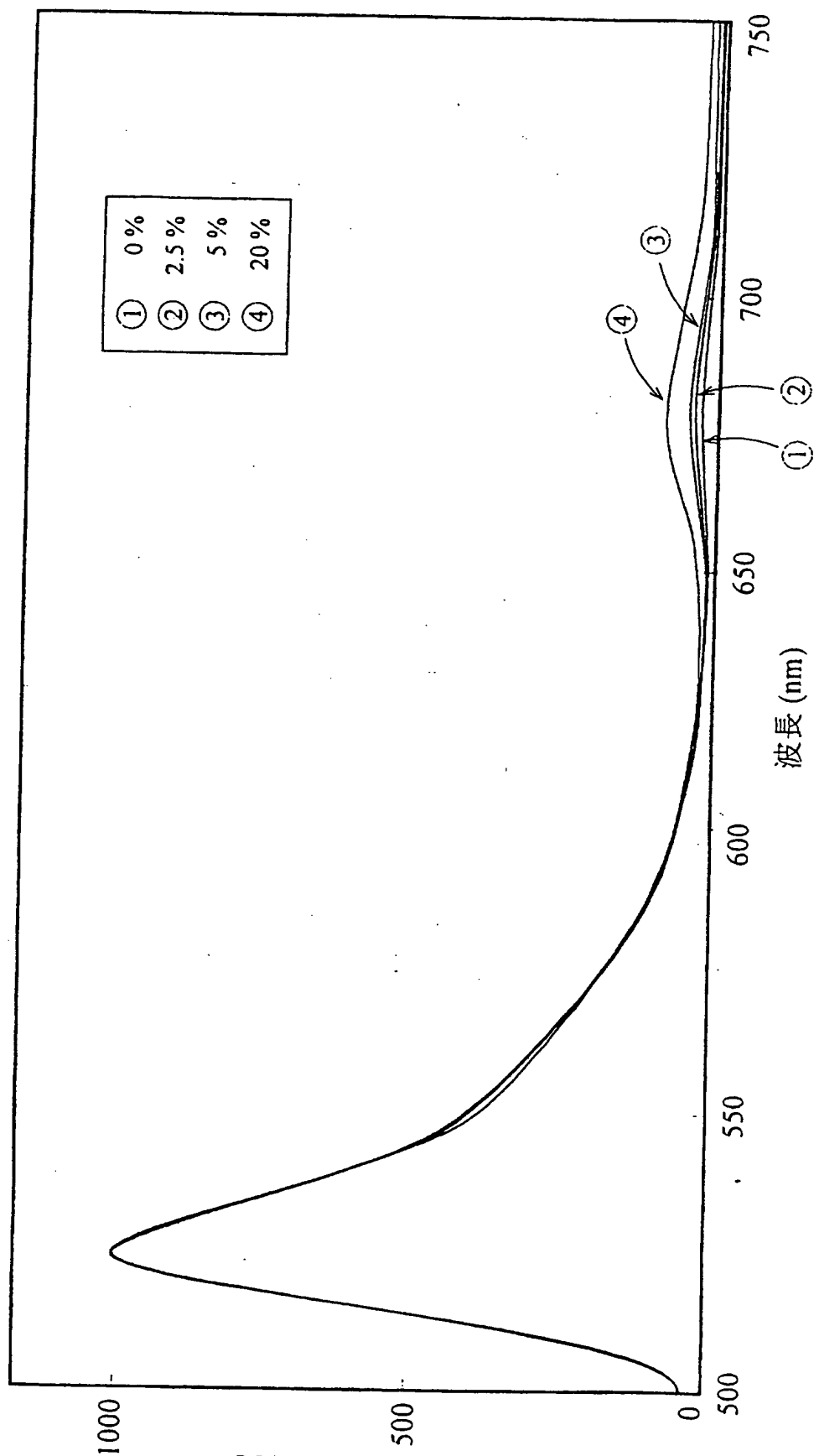
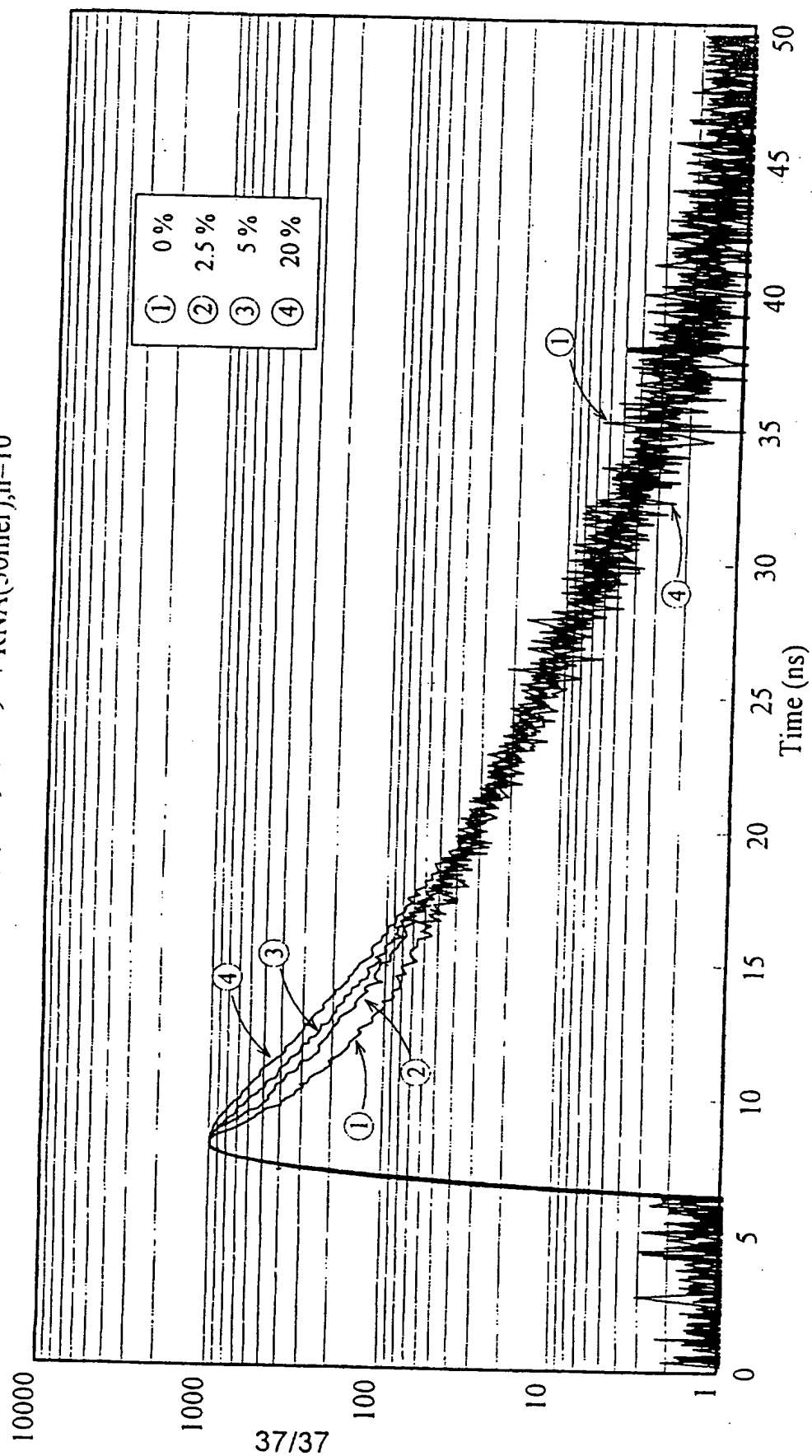


図38

S-オリゴプロ-ブ + RNA(30mer), $n=10$ 

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-508309, A (Molecular Probes Inc.) 14. 9月. 1995 (14. 09. 95) &WO, 93/23492, A1 &US, 5326692, A &EP, 596098, A1	1-18
A	JP, 7-502992, A (Nanotronics Inc.) 30. 3月. 1995 (30. 03. 95) &WO, 9309128, A1 &EP, 620822, A1 &US, 5532129, A &AU, 667497, B	1-18
A	JP, 7-63400, B2 (Molecular Biosystems Inc.) 12. 7月. 1995 (12. 07. 95) &US, 4996143, A &EP, 229943, B	1-18
A	JP, 7-63400, A (Hoffmann la Roche & Co. AG. F) 18. 1月. 1994 (18. 01. 94) &US, 5573904, A &EP, 566751, B	1-18
A	WO, 93/09185, A1 (Molecular Probes Inc.) 30. 3月. 1995 (30. 03. 95) &US, 5274113, A &EP, 612336, A1	8, 9, 17, 18

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03438

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/25518, A1 (社団法人 農林水産先端技術研究センター) 22. 8月. 1996 (22. 08. 96) & AU, 964,6338, A	1-18
A	JP, 3-17480, B2 (Standard Oil Co. Indiana) 8. 3月. 1991 (08. 03. 91) & EP, 70685, B & CA, 1190838, A	1-18
A	EP, 601889, A2 (Maine Medical Center Research Institute) 15. 6月. 1994 (15. 06. 94) & US, 5607834, A	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「I」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 97

国際調査報告の発送日 13.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 倫子

4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. C16 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. C16 C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/25518, A1 (The Society for Techno-Innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries), August 22, 1996 (22. 08. 96) & AU, 9646338, A	1 - 18
A	JP, 3-17480, B2 (Standard Oil Co. Indiana), March 8, 1991 (08. 03. 91) & EP, 7065, B & CA, 1190838, A	1 - 18
A	EP, 60188, A2 (Maine Medical Center Research Institute), June 15, 1994 (15. 06. 94) & US, 5607834, A	1 - 18
A	JP, 1-508309, A (Molecular Probes Inc.), September 14, 1995 (14. 09. 95) & WO, 93/23492, A1 & US, 5326692, A & EP, 596098, A1	1 - 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
December 11, 1997 (11. 12. 97)Date of mailing of the international search report
January 13, 1998 (13. 01. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03438

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-502992, A (Nanoronics Inc.), March 30, 1995 (30. 01. 95) & WO, 9309128, A1 & EP 620822, A1 & US, 5532129, A & AU, 567497, B	1 - 18
A	JP, 7-63400, B2 (Molecular Biosystems Inc.), July 12, 1995 (12. 07. 95) & US, 4996143, A & EP, 22943, B	1 - 18
A	JP, 7-63400, A (Hoffmann L. Roche & Co. AG. F), January 18, 1994 (18. 01. 94) & US, 5573904, A & EP, 566751, B	1 - 18
A	WO, 93/09185, A1 (Molecular Probes Inc.), March 30, 1995 (30. 03. 95) & US, 5274113, A & EP, 612336, A1	8, 9, 17, 18